

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Liis Mägi

**MikroRNAd kui potentsiaalsed biomarkerid vastuvõtliku endomeetriumi  
määramiseks**

Magistritöö biomeditsiini erialal (40 EAP)

Juhendajad: Kadri Rekker, MSc

Martin Pook, PhD

Alar Aints, PhD

TARTU 2017

## INFOLEHT

### **MikroRNAd kui potentsiaalsed biomarkerid vastuvõtliku endomeetriumi määramiseks**

Edukaks embrüo implantatsiooniks on vajalik vastuvõtliku endomeetriumi olemasolu. Endomeetriumi vastuvõtlikkuse kujunemist reguleerivad väga mitmed tegurid, nende hulgas ka mikroRNAd (miRNAd), mis on olulised transkriptsioonijärgsed geeniekpressiooni regulaatorid. Eesmärgiga leida biomarkereid vastuvõtliku endomeetriumi määramiseks, uurisime tervete ja viljatute naiste endomeetriumi koest ning vereplasmast eraldatud miRNA ekspressiooniprofiile eelretseptiivses ja retseptiivses faasis kasutades kvantitatiivse reaalaaja-PCR meetodit. Tervete uuritavate endomeetriumi koes olid miR-449a, miR-21-5p ja miR-141-3p ekspressioonitasemed statistiliselt oluliselt erinevad uuritavate tsüklifaaside vahel. Vereplasma miRNade tase uuritavate gruppide vahel ei erinenud. Lisaks tuvastasime endomeetriumi koest ja vereplasmast varasemalt annoteerimata miRNAsid ja leidsime vastavalt 41 ning 38 seni kirjeldamata miRNAd.

Märksõnad: mikroRNA, endomeetriumi vastuvõtlikkus, implantatsioon, viljatus, qRT-PCR.

CERCS teaduseriala: B220 Geneetika, tsütogeneetika

### **MicroRNAs as potential biomarkers for assessing endometrial receptivity**

Impaired uterine receptivity is believed to be one of the reasons for embryo implantation failure in assisted reproductive techniques. MicroRNAs are important posttranscriptional gene expression regulators and are shown to affect cyclic changes in the female reproductive tract. We aimed to find potential biomarkers for receptive endometrium by assessing miRNA expression profiles in receptive versus prereceptive human endometrium and blood plasma collected from healthy and infertile women using quantitative real time PCR. In healthy endometrium the expression levels of hsa-miR-449a, hsa-miR-21-5p and hsa-miR-141-3p showed statistically significant differences between receptive and prereceptive endometrium. Thus, mentioned miRNAs potentially regulate genes involved in endometrial receptivity. From blood plasma no miRNAs with statistically significant expression levels between studied groups were identified. Furthermore, we identified 41 novel candidate miRNAs in endometrium and 38 in blood plasma. However their role in endometrial receptivity remains to be elucidated.

Keywords: microRNA, endometrial receptivity, implantation, infertility, qRT-PCR.

CERCS research project: B220 Genetics, cytogenetics

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	7
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1    MikroRNAd .....	8
1.1.1    miRNAd biogenees .....	9
1.1.2    miRNAd kui biomarkerid .....	11
1.1.3    mikroRNAd määramise meetodid .....	13
1.2    Viljatus .....	14
1.2.1    Viljatuse ravi .....	16
1.3    Endomeetrium.....	17
1.3.1    Endomeetriumi morfoloogia ja muutused menstruaaltsükli jooksul .....	17
1.3.2    Endomeetriumi vastuvõtlikkus ja selle roll embrüo implanteerumisel .....	20
1.3.3    Endomeetriumi vastuvõtlikkuse uuringud .....	21
1.3.4    miRNAd ja endomeetriumi vastuvõtlikkus .....	23
2    EKSPERIMENTAALOSA .....	25
2.1    TÖÖ EESMÄRGID .....	26
2.2    MATERJAL JA METOODIKA .....	26
2.2.1    Valimi ja töövoogi kirjeldus .....	26
2.2.1.1    RNA eraldamine .....	28
2.2.2    miRNAd ekspressioonitaseme määramine .....	29
2.2.2.1    Uuritavad miRNAd .....	29
2.2.2.2    Endomeetriumi koeproovid.....	29
2.2.2.3    Vereplasma proovid .....	31
2.2.3    qRT-PCR andmete analüüs .....	33
2.2.4    Annoteerimata miRNAd analüüs .....	34
2.3    TULEMUSED .....	34
2.3.1    Uuritavate miRNAd ekspressioonitaseme erinevuse valideerimine tervete naiste LH+2 ja LH+8 endomeetriumis .....	34
2.3.2    Uuritavate miRNAd ekspressioonitaseme erinevuse valideerimine tervete naise vereplasmas .....	35
2.3.3    Uuritavate miRNAd ekspressioonitaseme erinevuse valideerimine viljatute ja tervete naiste vereplasmas .....	37
2.3.4    Annoteerimata miRNAd .....	38
2.2    ARUTELU .....	41

Summary.....	46
TÄNUAVALDUSED.....	47
KASUTATUD KIRJANDUS .....	48
KASUTATUD VEEBIAADRESSID JA PROGRAMMID .....	61
LIHTLITSENTS.....	1

## KASUTATUD LÜHENDID

AGO	<i>Argonaute</i>
ALS	Amüotroofne lateraalskleroos
ART	Abistava reproduktsiooni meetod ( <i>assisted reproductive technology</i> )
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide-nucleotide</i>
C3PO	<i>Component 3 promoter of RISC</i>
CAM	Raku adhesioonimolekul ( <i>cell adhesion molecule</i> )
cDNA	Komplementaarne DNA
Ct	Läbitsükkel ( <i>cycle threshold</i> )
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8</i>
E2	Östradiool
EDTA	Etüleendiamiintetraatsetaat
ERA	Endomeetriumi retseptiivsuse kiip ( <i>Endometrial Receptivity Array</i> )
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>
FC	Erinevus kordades ( <i>fold change</i> )
FDR	Valeavastuste määr ( <i>false discovery rate</i> )
FSH	Folliikuleid stimuleeriv hormoon
hCG	Inimese kooriongonadotropiin
ICSI	Seemneraku intratsütoplasmaatiline süstimine ( <i>intracytoplasmic sperm injection</i> )
IUI	Intrauteriinne inseminatsioon ( <i>intrauterine insemination</i> )
IVF	Kehaväline viljastamine ( <i>in vitro fertilisation</i> )
KMI	Kehamassiindeks
LH	Luteiniseeriv hormoon
LH+2	Preretseptiivne menstruaaltsükli faas

LH+8	Retseptiivne menstruaaltsükli faas
LIF	Leukeemiat inhibeeriv faktor
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
miRNA	MikroRNA
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MUC1	Mutsiin 1
MUC16	Mutsiin 16
NGS	Uue põlvkonna sekveneerimine ( <i>next generation sequencing</i> )
NOTED	<i>Non-invasive Tests for Endometrial Dysfunction</i>
P4	Progesteroon
PID	Väikevaagna põletik ( <i>pelvic inflammatory disease</i> )
pre-miRNA	Prekursor-miRNA
pri-miRNA	Primaarne miRNA
PSA	Eesnäärme-spetsiifiline antigeen
qRT-PCR	Kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )
RIF	Korduv implantatsioonihäire ( <i>recurrent implantation failure</i> )
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
SD	Standardhälve
ZEB	<i>Zinc finger E-box binding homeobox</i>
TRBP	<i>Transactivation-responsive RNA binding proteiin</i>
UTR	Mittetransleeritav ala ( <i>untranslated region</i> )
WOI	Implantatsiooniaken ( <i>window of implantation</i> )

## SISSEJUHATUS

Endomeetriumis toimuvad igakuised tsüklilised muutused, mis muudavad selle vastuvõtlikuks embrüo pesastumisele ehk implantatsioonile. Õnnestunud implantatsiooniks on vaja kvaliteetse embrüo ning vastuvõtliku endomeetriumi sünkroniseeritud molekulaarset dialoogi, kuid viljatuse raviks kasutatavate *in vitro* viljastamise meetodite puhul implanteerub efektiivselt emakasse vaid ligikaudu 30% siirdatud embrüotest. Ebaõnnestunud implantatsiooni üheks põhjuseks on tihti mittevastuvõtlik endomeetrium.

Hetkel puuduvad endomeetriumi seisukorra hindamiseks sobilikud biomarkerid, mis oleksid üheaegaselt nii väheinvasiivselt määratavad, spetsiifilised kui ka kiirelt ja täpselt detekteeritavad. Hiljutised uuringud on näidanud, et endomeetriumi tsüklilisi muutusi ning implantatsiooniperioodi embrüo ja endomeetriumi vahelist kommunikatsiooni võivad reguleerida mikroRNAd (miRNAd) - lühikesed mittekodeerivad RNA molekulid, mis on transkriptsioonijärgsed geeniekpressiooni regulaatorid. miRNAd ekspressioonimuster on koespetsiifiline ning võib varieeruda nii organismi normaalsete füsioloogiliste muutuste kui ka patoloogiliste protsesside käigus. Endomeetriumis reguleerivad miRNAd mitmete geenide ekspressiooni ja mõjutavad näiteks põletikumediaatorite avaldumist, koe reparatsiooni ning apoptootilist aktiivsust, aidates seeläbi kaasa normaalsetele tsüklilistele muutustele naise organismis. Analüüsides miRNAd ekspressiooniprofiili vastuvõtlikus endomeetriumis ning vereplasmas on võimalik leida potentsiaalseid biomarkereid, mida saaks kasutada viljatusravis embrüo implantatsiooniks sobivaima aja leidmiseks.

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli tuvastada endomeetriumi koest ning vereplasmast miRNAsid, mis võivad mängida rolli vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel ja mida saaks kasutada biomarkerina vastuvõtliku endomeetriumi määramiseks. Samuti soovisime leida endomeetriumi koest ning vereplasmast varasemalt annoteerimata miRNAsid. Uurimistöö viidi läbi Tervisetehnoloogiarenduskeskus AS-s.

## KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1 MikroRNAd

miRNAd on mittekodeerivad lühikesed (~21-25 nt) kõrgelt konserveerunud RNA molekulid, mis reguleerivad transkriptsioonijärgselt valke kodeerivate geenide avaldumist (ülevaateartiklist He ja Hannon, 2004). miRNAd seonduvad sihtmärk-mRNA (*messenger* RNA) komplementaarsetele 3' mittetransleeritavale järjestustele (UTR - *untranslated region*), mille tulemusena toimub mRNA lagundamine või translatsiooni mahasurumine (ülevaateartiklist Bartel, 2004).

Esimene miRNA avastati üle 30 aasta tagasi nematoodis *Caenorhabditis elegans*, kui Lee jt. leidsid, et vastsete arengus olulist rolli mängiv *lin-4* ei kodeeri valku, vaid väikeseid RNA molekule, millel esineb komplementaarsus mitmete piirkondadega *lin 14* mRNA 3'-UTR järjestuses. Tuvastati, et *lin-4* RNA paardub *lin-14*-ga ning seeläbi toimub *lin-14* translatsiooniline repressioon, mille tõttu läheb *C. elegans*'i vastne järgmisesse arengustaadiumisse (Lee jt., 1993; Wightman jt., 1993). Nüüdseks on kirjeldatud 223 erinevast liigist üle 35 000 küpse miRNA järjestuse (*miRBase* v21, 14. mai 2017 seisuga). Inimesel on praeguseks leitud 1881 juuksenõela struktuuri omavat prekursor-miRNAd ja 2603 küpset miRNA järjestust ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), 14. mai 2017 seisuga). Hinnatakse, et üle 60% valke kodeerivatest inimese geenidest sisaldavad evolutsiooniliselt konserveerunud järjestusi, millega miRNAd seonduvad saavad ning on ennustatud üle 45 000 3'-UTR regioonides asuva miRNA seondumissaidi esinemist (Friedman jt., 2009). Imetajatel on suurim arv miRNAsid, mistõttu korreleerub miRNAsid kodeerivate regioonide arv genoomis tõenäoliselt organismi keerukusega (Etheridge jt., 2011).

Kuna miRNAd ei seostu oma märklauaga alati täieliku komplementaarsusega, siis võib üks miRNA interakteeruda rohkem kui ühe märklauaga ja on seeläbi võimeline mõjutama mitmete geenide ekspressiooni. Samuti on ühel märklaudgeenil leitud mitmeid miRNA seondumisjärjestusi. Kuigi ühe miRNA mõju ühele märklaua ekspressioonile ei pruugi olla suur, siis mitmekümnete geenide kollektiivne repressioon võib oluliselt mõjutada rakke ning nende fenotüüpe (Kasinski jt., 2015). miRNade märklaudade leidmine on oluline, kuna seeläbi saame aimu miRNade bioloogilisest rollist organismis, samuti võimaldab sihtmärkide leidmine arendada välja miRNA põhiseid geeniteraapia meetodeid.

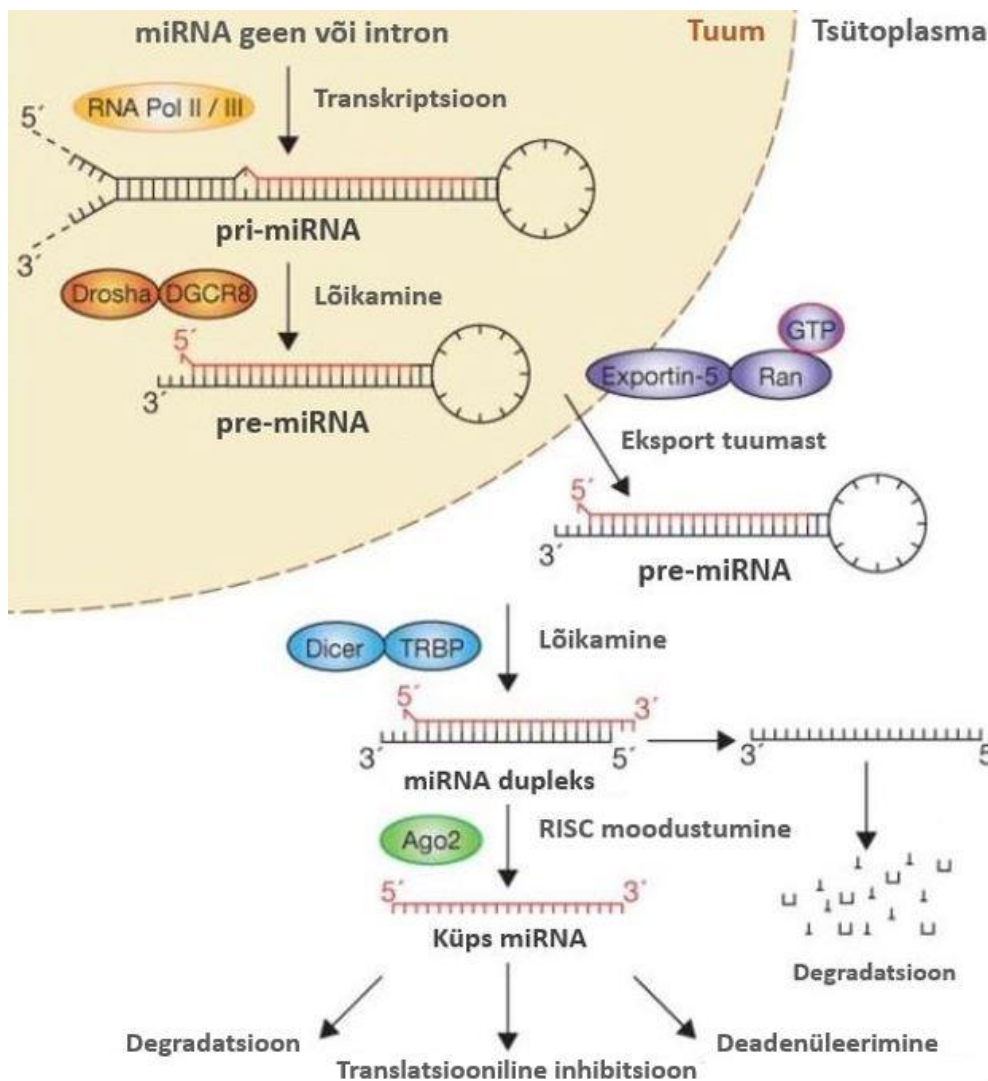
miRNade poolt vahendatud regulatsioon on paljude bioloogiliste protsesside võtmekomponent, näiteks on neil oluline roll ainevahetuses, patogeen-peremehe



interaktsioonides, apoptoosis, tüvirakkude arengus, rakkude proliferatsioonis, arenguprotsesside ajastuses ja kontrollis (Betel jt., 2008). On leitud, et miRNAde tase organismis on muutunud erinevate patoloogiliste seisundite korral. Analüüsides miRNAde haigusspetsiifilisi avaldumisprofiile on võimalik leida haiguste diagnoosimiseks ning haiguskulu ja ravimivastuse jälgimiseks sobivaid biomarkereid (Hammond, 2015).

### 1.1.1 miRNAde biogenees

Loomset päritolu miRNA biogenees on mitmeetapiline protsess (Joonis 1). miRNA geen transkribeeritakse tuumas RNA polümeraas II või III poolt ning moodustub algne transkript ehk primaarne miRNA (pri-miRNA) (Borchert jt., 2006; Lee jt., 2004). RNAas III endonukleas Drosha ning kaheahelalise RNAGA seonduv DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*) moodustavad kompleksi ning lõikavad pri-miRNA juuksenoela basaalse osa lähedalt prekursor-miRNAks (pre-miRNA) (Han jt., 2004; Lee jt., 2003). Eksportiin-5 ja Ran-GTP vahendusel transporditakse pre-miRNA tuumast tsütoplasmasse, kus endonukleas Dicer lõikab TRBP valgu (*transactivation-responsive RNA binding protein*) kaasabil kaheahelalise pre-miRNA umbes 21 aluspaari pikkuseks miRNA dupleksiks (Bernstein jt., 2001; Chendrimada jt., 2005; Yi jt., 2003). miRNA dupleks on 5'-fosfaatide ja 3'-üleulatuvate otstega ning dupleksi ahelate eristamiseks kasutatakse järelliiteid -3p ja -5p (varasemalt tähistus miRNA-miRNA\*) (Basyuk jt., 2003). Kanoonilise mudeli järgi on üks ahelatest funktsionaalne e. küps (*mature*) ning teine temaga osaliselt komplementaarne *passenger* ahel. Dupleksi ahelad keeratakse lahti ning küps miRNA ahel seotakse RISC (*RNA-induced silencing complex*) kompleksiga (Hammond, 2015). Varasemalt arvati, et *passenger* ahel degradeeritakse, kuid hiljutised uurimused on näidanud et dupleksi mõlemad ahelad võivad sõltuvalt koest ja rakutüübist osaleda geeniekspressiooni regulatsioonis (Ohanian jt., 2013; Yang jt., 2011).



**Joonis 1. miRNA biogenees.** Tuumas transkribeeritakse RNA polümeraasi II või III abil pri-miRNA. Transkript lõigatakse ensüümkompleksi Drosha-DGR8 abil pre-miRNAks ning viiakse eksportiin-5-Ran-GTP kompleksi abil tuumast tsütoplasmasse. Dicer-TRBP kompleks lõikab pre-miRNA-d nii, et tekib miRNA dupleks. Dupleksi funktsionaalne osa (punane) ühineb Ago2 valgu abil RISC kompleksiga, mis tunneb sihtmärkgeenide 3'-UTR järjestustes ära komplementaarsed saidid ja valgu ekspressioon surutakse maha. Märklauud-mRNA ning miRNA vahelise komplementaarsuse ulatusest sõltub, millise mehhanismi kaudu toimub geeniekspressiooni kontroll (kohandatud Winter jt., 2009 järgi).

RISC on multiproteiinkompleks, mis koosneb imetajatel peamiselt AGO (*Argonaute*) perekonna valkudest, kus Ago2 vastutab *passenger* ahela lõikamise eest ning on oluline RISCi aktivatsioonis (Rand jt., 2005). AGO valkudega seonduvad omakorda TNRC6 valgud (GW182 putukates), mis mõjutavad sihtmärk mRNAde deadenülatsiooni ja translatsioonilist repressiooni (Fabian jt., 2011). Samuti kuuluvad RISC kompleksi Dicer ja TRBP (MacRae jt., 2008), endonukleas C3PO (*component 3 promoter of RISC*; Ye jt., 2011) ning teised translatsiooni moduleerimise seotud valgud.

miRNA toimib RISC kompleksis giidmolekulina ning sihtmärgiga seondumiseks on oluline miRNA 5' otsas olev 2-7 nukleotiidi pikkune *seed*-regioon (Lewis jt., 2003). miRNA-RISC kompleks seondub sihtmärk-mRNA 3'-UTR järjestusega komplementaarsuse alusel (Lai, 2002). mRNA ja miRNA täieliku paardumise korral indutseerib RISC mRNA degradatsiooni. Mittetäieliku paardumise korral surutakse alla translatsioon (Pratt ja MacRae, 2009). On leitud, et mRNAga seondumine võib toimuda ka 5'-UTR järjestusele ja sellisel juhul toimib miRNA geeniekspressiooni aktivaatorina (Ørom jt., 2008). miRNAd võivad ka RISC kompleksist sõltumatult otse valkudele seonduda (Eiring jt., 2010), samuti reguleerida geenide transkriptsiooni kas seondudes otse sihtmärkgeeni promootorile või moduleerides sihtmärgi promootori metülatsioonimustrit (Gonzalez jt., 2008; Khraiwesh jt., 2010; Kim jt., 2008).

### **1.1.2 miRNAd kui biomarkerid**

Biomarkeriks nimetatakse normaalse bioloogilise protsessi, patoloogilise protsessi või ravimivastusega seotud tunnust, mida on võimalik objektiivselt mõõta ja hinnata (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Biomarkerid on näiteks pulss, vererõhk, PSA ehk eesnäärme-spetsiifilise antigeeni hulk vereseerumis või loote kuklavoldipiirkonna vedelikukogumi suurus. Ideaalne biomarker peab vastama mitmetele kriteeriumitele sõltuvalt sellest, kuidas seda kasutatakse: detekteeritav enne haiguse kliinilisi sümptomeid, spetsiifiline uuritava patoloogia ja/või koe suhtes, väheinvasiivne, mittesõltuv keskkonnast ning uuritava patoloogiaga mitteseotud seisunditest, tundlik haiguse kulu suhtes ning kiire, lihtsa, täpse ja odava detekteerimismeetodiga (Etheridge jt., 2011). Kuna mitmete haiguste, näiteks endometrioosi diagnoosimiseks ning haiguskulu jälgimiseks kasutatakse praegu peamiselt invasiivseid meetodeid on stabiilsete ning lihtsalt mõõdetavate biomarkerite leidmine mitmete haiguste uurimisel suureks väljakutseks. Informatiivsete biomarkerite leidmine aitaks meil mõista haiguste patofüsioloogilisi protsesse, parandada diagnostikameetodeid ja jälgida haiguse kulgu ning arendada uusi ravivõimalusi (Wang jt., 2016).

Koepõhiste miRNA biomarkerite leidmiseks kasutatakse põhiliselt miRNAd ekspressiooniprofiili erinevuse võrdlust normaalses ning kahjustatud koes (Pritchard jt., 2012a). Koepõhiseid miRNA biomarkereid on otsitud erinevate vähitüüpide, ainevahetushäirete, autoimmuunhaiguste, psühhiaatriliste ja neuroloogiliste häirete ning paljude muude haiguste korral (Buckley jt., 2010; Guerau-de-Arellano jt., 2012; Heneghan jt., 2011; Lai jt., 2011).

Lisaks rakkude sisestele nukleiinhapetele on RNA ja DNA molekulid detekteeritavad erinevates kehavedelikes rakuvabal kujul. Ekstratsellulaarseid miRNAsid on leitud enamikes kehavedelikes, sealhulgas vereseerumis ja -plasmas, rinnapiimas, süljes, uriinis, seemne- ning spinaalvedelikus (Cogswell jt., 2008; Gallo jt., 2012; Hanke jt., 2010; Kosaka jt., 2010; Wang jt., 2011). Esimest korda näidati tsirkuleerivate miRNAde võimalikku kasutust biomarkerina 2008. aastal, kui Lawrie jt. leidsid, et difuusse B-suurerakulise lümfoomi patsientidel on tervete kontrollidega võrreldes teatud miRNAde tasemed vereseerumis tõusnud (Lawrie jt., 2008; Wang jt., 2016). Kui enamus RNA molekule on rakuvälises keskkonnas ebastabiilsed, siis tsirkuleerivad miRNAd on stabiilsed ning vastupidavad erinevatele tingimustele (Etheridge jt., 2011). Seerumis ning teistes kehavedelikes on väliste patogeenide kaitseks ribonukleaasid (Weickmann ja Glitz, 1982), vabalt tsirkuleerivad miRNAd on degradatsiooni eest kaitstud olles pakitud membraanvesiikulitesse (sh eksosoomid, apoptootilised kehakesed ja mikrovesiikulid), seotud lipoproteiinidega või RNAd siduvate valkudega (Valadi jt., 2007; Vickers jt., 2011; Zernecke jt., 2009). Samuti on leitud, et miRNAd on väga vastupidavad erinevatele keskkonnatingimustele nagu keetmine, korduv külmutamine ja sulatamine, suured pH-muutused ja pikaajaline säilitamine (Chen jt., 2008).

Tsirkuleerivate miRNAde eeliseks on nende stabiilsus ning vastupidavus, samuti on proovimaterjali võtmine üldjuhul patsiendi jaoks väheinvasiivne. Seetõttu peetakse tsirkuleerivaid miRNAsid perspektiivikateks väheinvasiivseteks biomarkeriteks paljude haiguste ning patoloogiliste protsesside korral, näiteks allergiline astma, melanoom, amüotroofne lateraalskleroos (ALS) ja autism (Fogli jt., 2017; Kichukova jt., 2017; Milger jt., 2017; Waller jt., 2017).

Siiski tuleb miRNAde uurimisel silmas pidada, et seerumis esinevate miRNAde profiil on tugevas seoses vererakkudes esinevate miRNAdega. Hemolüüs ning vererakkude hulga kõrvalekalded veres võivad seerumi miRNAde taset mõjutada kuni 50 korda (Pritchard jt., 2012b). Kuna vähi biomarkerite puhul on leitud, et need on kõrgelt ekspresseeritud ka vererakkudes, siis tuleb tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta asjaolu, et mõõdetud miRNAde tasemed võivad peegeldada vererakkude-, mitte vähi- või muu uuritava patoloogiaspetsiifilist päritolu (Pritchard jt., 2012b). miRNAde tasemed võivad olla mõjutatud ööpäevasest kõikumisest, mistõttu tuleb miRNAde uurimisel arvestada ka proovi võtmise ajaga (Rekker jt., 2015).

### 1.1.3 mikroRNAd määramise meetodid

miRNAd määramiseks ning kvantifitseerimiseks uuritavatest proovidest kasutatakse peamiselt kvantitatiivset reaalaaja PCRi (qRT-PCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*), mikrokiibi-põhiseid hübriidisatsioonimeetodeid ning RNA sekveneerimist (Pritchard jt., 2012a). Igal meetodil on oma tugevused ja nõrkused ning meetodil valikul tuleb lähtuda konkreetse uurimuse eesmärkidest. miRNAd määramine ning kvantifitseerimine võib osutuda tehniliselt raskeks, kuna nad on lühikesed ja suure homoloogiaga erinevate miRNA perekondade vahel. Samuti esineb küps miRNA järjestus ka pri-miRNA ning pre-miRNA transkriptides ning küpsetel miRNadel on erinevad isovormid (Jensen jt., 2011; Leshkowitz jt., 2013).

qRT-PCRi esimeses etapiks on pöördtranskriptsioon, kus miRNA põhjal sünteesitakse komplementaarne DNA (cDNA). Seejärel toimub PCR reaktsioon, kus registreeritakse iga PCR tsükli vältel fluorestseeruva värviga märgistatud produkti akumulereerumine. qRT-PCR põhised miRNAd kvantiseerimise meetodid on suhteliselt odavad ning laialdaselt kättesaadavad, samuti on võimalik mõõta väga väikest hulka miRNAsid. Tulenevalt küpsete miRNAd sarnasest pikkusest klassikaliste qRT-PCRi praimeritega on miRNAd detekteerimine tavapraimeritega tehniliselt keeruline (Etheridge jt., 2011). Küpsete miRNAd järjestuse efektiivseks kvantiseerimiseks töötati välja juuksenõela struktuuriga (*stem-loop*) praimerid, mis ligeeritakse miRNA 3' otsa ning toimub pöördtranskriptsioon. Saadud produkt kvantifitseeritakse kasutades miRNA spetsiifilist *forward* praimerit, *reverse* praimerit ning TaqMani sondi, mis sisaldab fluorestseeruvat värvi (Chen jt., 2005).

Teatud proovimaterjalide, näiteks formaliini fikseeritud koeproovide ja vereplasma- ning seerumi puhul on miRNA tase väga madal. Lisaks võib plasmast eraldatud RNA sisaldada inhibiitoreid. Võttes arvesse ka miRNAd pikkust, võivad eelmainitud tunnused oluliselt mõjutada qRT-PCR efektiivsust. qRT-PCRi spetsiifilisuse ja tundlikkuse suurendamiseks arendasid Andreassen jt. välja uue meetodi miRNAd uurimiseks, kus universaalses pöördtranskriptsiooni etapis lisatakse küpsele miRNA ahelale polü-A saba ning sünteesitakse polü-T praimerit kasutades cDNA (Andreassen jt., 2010). Erinevalt geenispetsiifilisest cDNA pöördtranskriptsioonist võimaldab universaalne cDNast sadade märklaudade tuvastamist samast cDNA sünteesist ning seeläbi väheneb reaktsioonidest vajaliku proovimaterjali kogus. Samas on meetodi tundlikkus väiksem kui geenispetsiifiline cDNA süntees. Tundlikkuse suurendamiseks võtsid Andersen jt miRNAd amplifitseerimise etapis kasutusele miRNA-spetsiifilised LNA-ga (*Locked Nucleic Acid*) rikastatud praimerid. LNA lisamine praimeritele võimaldab lühikeste ja väga spetsiifiliste *forward* praimerite disaini, mis katavad enamiku

miRNA järjestustest. Samuti on LNA-ga rikastatud ka *reverse* praimer, mis katab miRNA järjestuse 3' otsa (Andreasen jt., 2010).

Mikrokiibi-põhiseid meetodeid saab kasutada sadade miRNAde ekspressioonitaseme samaaegseks mõõtmiseks, kuid väikse spetsiifilisuse tõttu on vajalik tulemuste valideerimine qRT-PCRiga. Lisaks on analüüsiks vajamineva RNA hulk suurem ning andmete analüüs keerukam kui qRT-PCRil (Moreno-Moya jt., 2014). Meetodi plussiks on tema odavus ning kättesaadavus (Etheridge jt., 2011).

RNA sekveneerimine algab RNA raamatukogu koostamisega, kus adapterid ligeeritakse miRNAde 5' ja 3' otstesse, seejärel toimub pöördtranskriptsioon ning PCR amplifikatsioon (Moreno-Moya jt., 2014). Adapterid kinnitatakse olenevalt platvormist kas näiteks tahkele kandjale (Illumina) või kerakestele (SOLiD, Applied Biosystem). Järgnev sekveneerimisetapp ja signaali lugemine on sõltuvalt platvormist erinev (Pritchard jt., 2012a). Uue põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad ei vaja järjestusspetsiifilisi primereid ning nende abil on võimalik mõõta miRNAde absoluutset hulka proovis ja avastada uusi miRNAsid (Etheridge jt., 2011). Sekveneerimise miinuseks on kallis hind ja proovide ettevalmistuse ning andmete analüüsi töömahukus (Pritchard jt., 2012a).

## 1.2 Viljatus

Viljatuseks nimetatakse olukorda, kus paaril ei ole õnnestunud rasestuda vähemalt aasta jooksul vaatamata regulaarsele ja kaitsmata suguelule (Jose-Miller jt., 2007). Viljatus on sagenev probleem, mis puudutab maailmas hinnanguliselt 9% paaridest (European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 2016 *fact sheet*). Eestis on ligikaudu 15 000 – 20 000 viljatut paari (Haller-Kikkatalo jt., 2009; Kalinina ja Matt, 2003).

Eristatakse primaarset ja sekundaarset viljatust. Primaarse viljatuse korral ei ole naine kunagi lapseootele jäänud. Sekundaarse viljatuse puhul ei ole naine varasema elussünni järgselt enam rasestunud või eluvõimelist last sünnitanud (Mascarenhas jt., 2012). Paari lastetus on umbes 20-35% juhtudel põhjustatud naise- ning kuni 30% juhtudel mehepoolsest viljatusest, 25-40% võivad paari viljatusprobleemid olla tingitud mõlemast partnerist (ESHRE, 2016). Umbes 15% juhtudest ei tuvastata kindlat viljatuse põhjust (Gelbaya jt., 2014).

Naise viljakust mõjutab suurel määral vanus ning viljakusnäitajate äkilisemat langust on näidatud pärast 35. eluaastat (Kenny jt., 2013; de la Rochebrochard ja Thonneau, 2002; Pracice

Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2014). Vanuse mõju viljakusele sõltub kolmest tegurist: (i) organismi loomulik vananemine, (ii) läbipõetud haiguste ning traumade kumulatiivne mõju reproduktiivsüsteemile ning (iii) elukeskkond ja sotsiaalsed ning majanduslikud tegurid (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Põhiline viljatust mõjutav tegur vananemise puhul on munasarjade funktsiooni häirumine ning munarakkude reservi vähenemine, millega kaasneb ka munarakkude kvaliteedi langus (Broekmans jt., 2007). Naise reproduktiivsüsteemi toimimise puhul on väga oluline hüpotalamuse-ajuripatsi-ovariaalse süsteemi koordineeritud regulatsioon. Süsteemi häirumisel tekivad muutused hormonaalses tasakaalus, mille tõttu tekivad ovulatsioonihäired ja on ka häiritud munarakkude küpsemine ning vabanemine. Ovulatsioonihäired on rohkem kui pooltel juhtudel tingitud polütsüstiliste munasarjade sündroomist, mida iseloomustab oligo- või amenorröa, polütsüstilised munasarjad, suurenenud androgeenide sünteesist põhjustatud meessuguhormoonide tase, rasvumine ja insuliiniresistentsus (Teede jt., 2010). Samuti võib ovulatsioonihäirete põhjuseks olla enneaegne ovariaaluudulikkus, kus normaalne munasarja funktsionaalsus lõpeb alla 40. aasta vanustel naistel munasarja folliikulite vähenemise tõttu (Unuane jt., 2011).

Munajuhade ehk tubaarse viljatuse korral on takistatud seemnerakkude ligipääs munarakuni, viljastatud munaraku liikumine emakasse või embrüo implantatsioon (Seracchioli jt., 1997). Kõige sagedasem tubaarse viljatuse põhjustaja on väikevaagna põletik (PID – *pelvic inflammatory disease*), mis suurel osal juhtudest on põhjustatud *Chlamydia trachomatis*’e ja *Neisseria gonorrhoeae* tekitatud sugulisel teel levivate bakteriaalsete infektsioonide, vastavalt klamüüdia ja gonorröa, tüsistusest (Edmonds, 2012). PID võib viia endometriidi ja munajuhasiseste liidete tekkimiseni või munajuha valendiku sulgumiseni (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Tubaarne viljatus võib tekkida ka kirurgiliste protseduuride ja endometrioosi tagajärjel. Endometrioos on östrogeenist sõltuv haigus, mille puhul endomeetriumi sarnane kude paikneb ja funktsioneerib väljaspool emakaõõnt. Endometrioosi kolletes toimub sarnaselt emakas olevale endomeetriumile selle lagunemine menstruatsiooni ajal (Bulun, 2009). Kõhuõõnde valguv veri kutsub esile põletikulisi reaktsioone ning liitelisi protsesse, millega võib kaasneda viljakuse vähenemine või viljatus. Endometrioosi tõttu võib halveneda endomeetriumi vastuvõtlikkus, kahjustuda munajuhade funktsioneerimine ning munaraku ja embrüo areng ning väheneda implantatsioonimäär (Burney jt., 2007; Fadhlouji jt., 2014). Üheks viljatuse põhjuseks võivad olla ka emakaõõnes esinevad patoloogiad ning anomaaliad, näiteks polüübid, liited ja müoomid, mis takistavad embrüo kinnitumist emaka limaskestale või platsenta moodustumist (Rai ja Regan, 2006). Autoimmuunseid mehhanisme ning mitmete autoantikehade suurenenud produktsiooni seostatakse erinevate viljatuse

põhjustega (Reimand jt., 2001). Viljatutel naistel on täheldatud erinevate autoantikehade esinemist, näiteks on leitud suurenenud anti-ovariaalsete antikehade esinemist enneaegse ovariaaluudulikkusega naistel (Kelkar jt., 2005). Endometrioosiga naistel on täheldatud endomeetriumi vastaste antikehade esinemist. Antifosfolipiid-antikehi on seotud seletamatu viljatuse ning implantatsioonihäiretest tingitud korduva raseduse katkemisega (Sarapik jt., 2010).

### 1.2.1 Viljatuse ravi

Viljatusravi meetodi valik sõltub viljatuse põhjusest ning raskusest. Ovulatsiooni- ning spermatogeneesi häirete korral kasutatakse peamiselt hormonaalseid preparaate koos empiirilise raviga (Kathrins ja Niederberger, 2016; Legro jt., 2013). Operatiivset ravi kasutatakse endometrioosikollete ja -liidete eemaldamiseks, emakaõõne patoloogiate ja munajuhade kahjustuste puhul (Baazeem jt., 2011; Bulun, 2009; Jose-Miller jt., 2007). Hormoonravi ning kirurgilist sekkumist kasutatakse sageli koos. Intrauteriinne inseminatsioon (IUI – *intrauterine insemination*) on meetod, mille käigus viiakse töödeldud sperma peenikese kateetri abil emakaõõnde. Protseduur toimub loomuliku või stimuleeritud ovulatsiooni ajal ning juhul, kui naise munajuhad on läbitavad. IUI näidustusteks on peamiselt mehepoolset viljatuse põhjused - halvenenud sperma kvaliteet ja vähenenud ejakulaadi hulk, samuti ka seletamatu viljatus (Tournaye, 2012).

Abistava reproduktsiooni meetodid (*assisted reproductive technology* – ART) hõlmavad erinevaid protseduure ja meetodeid, kus raseduse saavutamise eesmärgil toimub muna- ning seemnerakkude ja embrüote *in vitro* ehk kehaväline käitlemine (Zegers-Hochschild jt., 2009). *In vitro* viljastamine (IVF – *in vitro fertilisation*) ehk kehaväline viljastamine on esimene kasutuselevõetud ART meetod ning esimene kehavälise viljastamise abil saadud laps sündis 1978. a Inglismaal (Stephoe ja Edwards, 1978), 1995. aastal sündis Eestis esimene Baltimaade IVF laps (Sõritsa jt., 1997). Eestis on peamine IVF ravi näidustus tubaarne viljatus (46%) ning sellele järgneb mehepoolne viljatus (42%) (Tonsiver jt., 2013). Maailmas on ART meetodite abil sündinud hinnanguliselt üle viie miljoni lapse (ESHRE, 2016).

IVFi protseduuri esimeseks etapiks on kontrollitud ovariaalne stimulatsioon, mille tulemusena stimuleeritakse eksogeense FSH ning GnRH agonisti või antagonistiga mitmete munarakkude üheaegset küpsemist (Zegers-Hochschild jt., 2009). Munarakud kogutakse ultrasonograafia kontrolli all tupe kaudu tehtava munasarja punktsiooniga. Teiseks etapiks on kehaväline viljastamine ning embrüote inkubatsioon. Viljastamiseks eraldatakse seemnevedelikust kõige viljastamisvõimelisemad spermid ning munarakke inkubeeritakse eelnevalt töödeldud



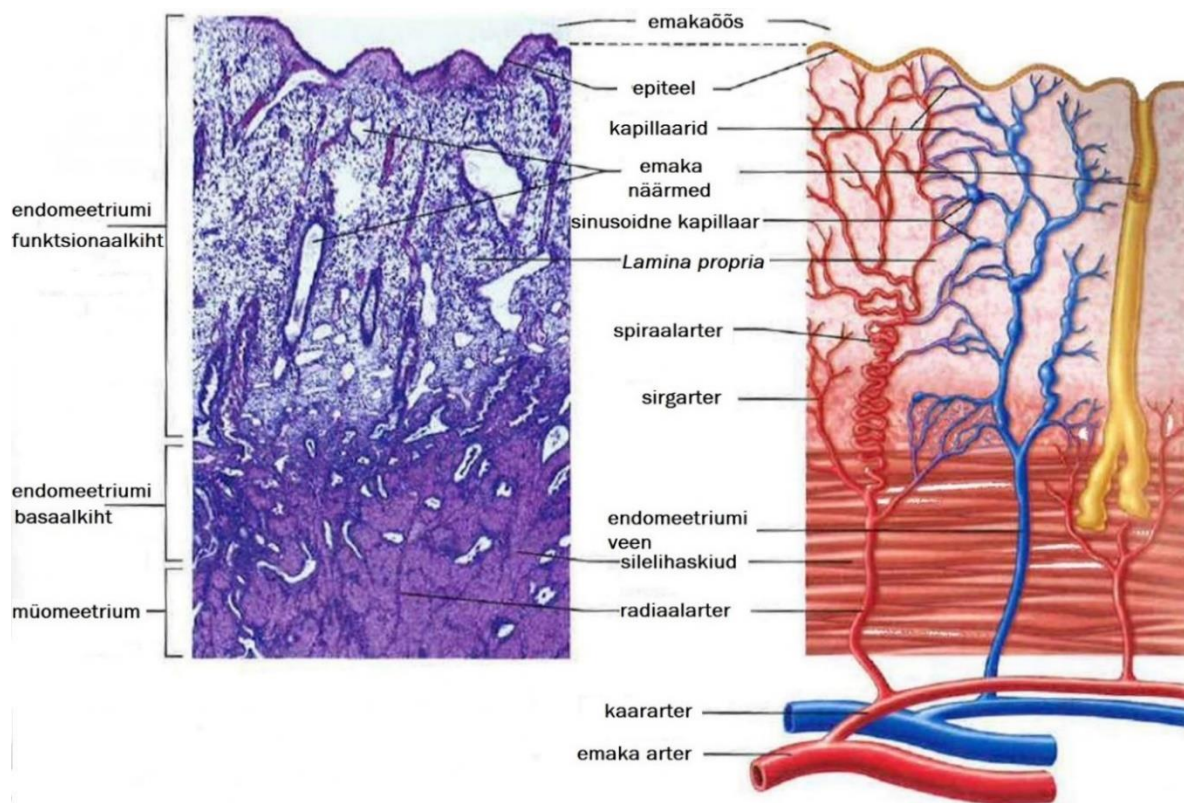
spermidega 12-18 h. Viimaseks etapiks on kvaliteetsete embrüote valik ning emakasse siirdamine, mis toimub harilikult 2-3 (embrüod 4-8 raku staadiumis) või 5 (blastotsüsti staadiumis) päeva pärast viljastamist. Tavaliselt viiakse emakasse 1-2 embrüot. Siirdamisest üle jäänud embrüod võib külmutada ja säilitada külmutatuna kuni seitse aastat (Huang ja Rosenwaks, 2012; Van Voorhis, 2007; Kunstliku viljastamise ja embrüokaitse seadus, 2015). Raskemate sperma patoloogiate puhul on võimalik koos IVFiga kasutada seemneraku tsütoplasmasisest süstimist (ICSI – *intracytoplasmic sperm injection*), kus seemerakk süstitakse otse munarakku (Lu jt., 2012).

ART tulemuslikkus on ühe ravitsükli kohta ligikaudu 30%. Euroopa kliinikute andmetel oli 2011. aastal rasestumise osakaal embrüo ülekannetest ühe IVFi tsükli kohta 33,2% (Eestis 36,3%) ning ICSI puhul 31,8% (Eestis 34,3%) (European IVF-Monitoring Consortium jt., 2016). Korduvat IVFi ebaõnnestumist seostatakse emakaõõne patoloogiate, tsütokiinide ekspressioonimuutuste, ebapiisava endomeetriumi tiheduse ja immuunprobleemide tõttu vähenenud endomeetriumi vastuvõtlikkusega (Margalioth jt., 2006).

### **1.3 Endomeetrium**

#### **1.3.1 Endomeetriumi morfoloogia ja muutused menstruaaltsükli jooksul**

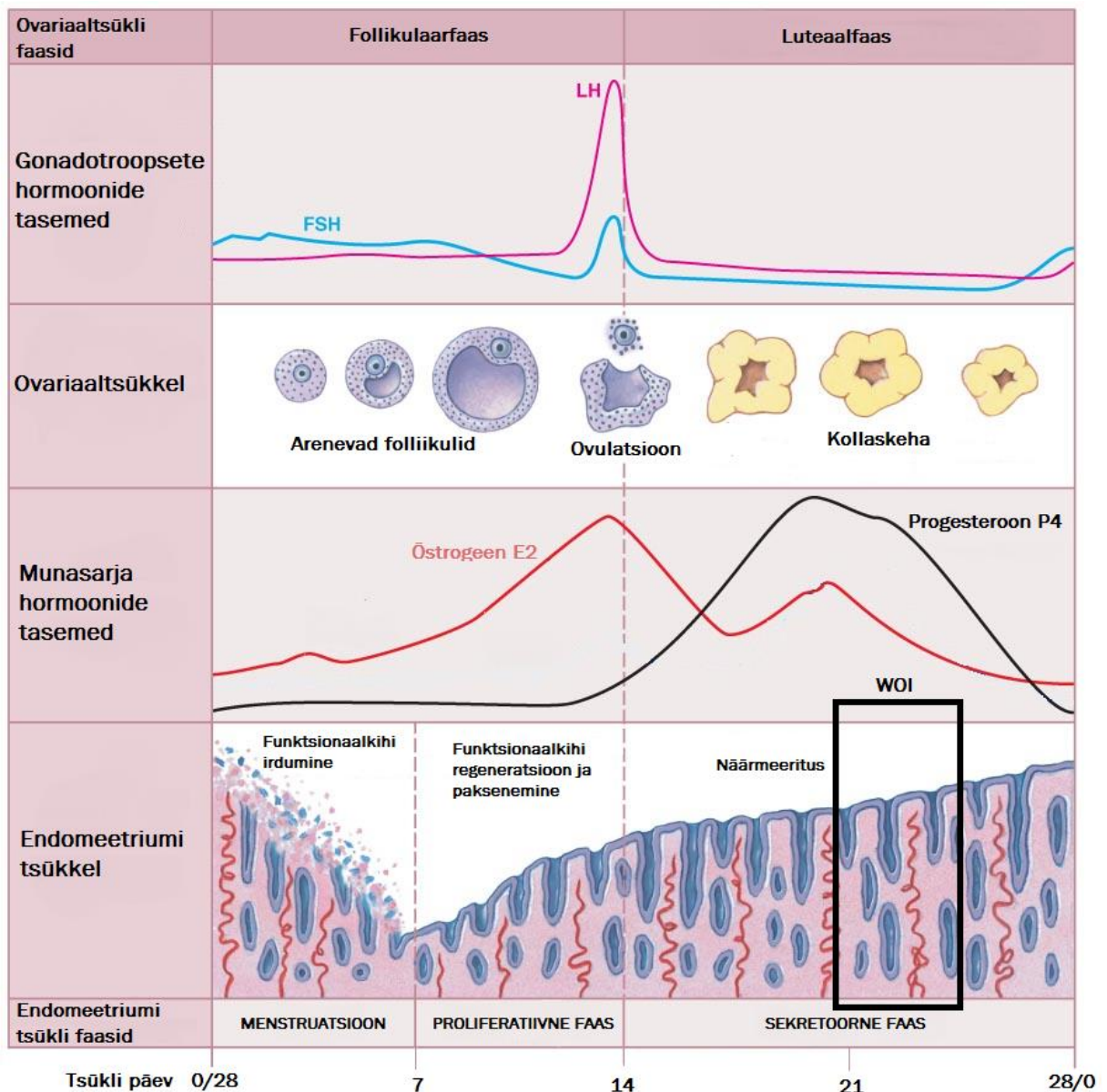
Emakaõõne sisepinda vooderdavat dünaamilist kude nimetatakse endomeetriumiks ehk emaka limaskestaks. Endomeetrium on suure regeneratsioonivõimega ning koosneb ühekihilisest silinderepiteelist ning selle all olevast sidekoelisest stroomast, mis sisaldab näärmeepiteeli, fibroblaste, endoteelirakke ning leukotsüüte (Diedrich jt., 2007). Endomeetrium jaguneb morfoloogiliselt kaheks kihiks, pindmiseks ehk funktsionaalkihiks ja süva- ehk basaalkihiks, mis erinevad nii struktuuri kui ka funktsiooni poolest (Jabbour jt., 2006).



**Joonis 2. Läbilõige endomeetriumi koest ja endomeetriumi verevarustusest** (Marieb ja Hoehn, 2010) järgi. Vasakpoolsel pildil on endomeetriumi koe pikilõik, nähtavad on endomeetriumi funktsionaal- ja basaalkiht ning osaliselt müomeetrium. Parempoolsel pildil on kujutatud endomeetriumi verevarustuse skeem.

Erinevate endomeetriumi rakkude geeniekspressiooni reguleerivad peamiselt munasarja steroidhormoonid östradiol (E2) ja progesteron (P4) ning parakriinselt sekreteeritud molekulid naaberrakkudest. Sellise regulatsiooni tõttu toimuvad endomeetriumis igakuised molekulaarsed, morfoloogilised ning funktsionaalsed muutused, mis moodustavad keskmiselt 28-päevase menstruaaltsükli (Joonis 2) (Ruiz-Alonso jt., 2012).

Menstruaaltsükli jooksul toimuvad muutused valmistavad endomeetriumi ette embrüo võimalikuks pesastumiseks ehk implantatsiooniks. Menstruaaltsükli võib jagada kolme faasi: menstruaalfaas, proliferatiivne faas ja sekretoorne faas (Joonis 3).



**Joonis 3. Menstruaaltsükli faasid ja hormonaalne regulatsioon** (Martini jt., 2013) järgi. Joonisel on kujutatud menstruaaltsükli jooksul toimuvad muutused munasarjas ning endomeetriumis ja peamiste osalevate hormoonitasemete kõikumised. Katkendliku vertikaaljoonega on tähistatud tsükli keskel toimuv ovulatsioon. Implantatsiooniaken (WOI - *window of implantation*) tähistab perioodi, mil endomeetrium on valmis embrüo pesastumiseks.

Tsükli esimeseks päevaks loetakse menstruaalverejooksu algust, kus irdub endomeetriumi funktsionaalkiht. Tsükli proliferatiivses faasis toimub E2 mõjul peamiselt DNA sünteesi ning rakujagunemisega seotud geenide aktivatsioon (Lessey, 2010). Basaalkihist lähtuvalt toimub funktsionaalkihi regeneratsioon ja paksenemine, angiogenees ning näärmete moodustumine (Chan jt., 2004). Proliferatiivse faasi lõpus pärast E2, luteiniseeriva hormooni (LH) ja folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) eritumise maksimumi toimub küpse munaraku vabanemine munasarja folliikulist ehk ovulatsioon ning kollaskeha moodustumine (Hawkins ja

Matzuk, 2008). Sekretsioonifaasis toimub kollaskeha toodetud P4 toimel endomeetriumi diferentseerumine ja embrüo võimalikuks implantatsiooniks ette valmistamine (Lessey, 2010). Algab näärmearitus, endomeetriumis asuvad stroomarakud laienevad, moodustuvad spiraalarterid, näärmepiteeli tekivad glükogeenipõiekesed ning tiheneb veresoonte võrgustik (Jabbour jt., 2006). Kui rasestumist ei toimu, siis kollaskeha taandareneb ning põhjustab E2 ja P4 taseme languse organismis, mis viib uuesti funktsionaalkihi lagunemiseni (Fritz ja Speroff, 2011).

### **1.3.2 Endomeetriumi vastuvõtlikkus ja selle roll embrüo implanteerumisel**

Igakuised tsüklilised muutused toimuvad selleks, et valmistada endomeetrium ette võimalikuks embrüo implantatsiooniks ehk pesastumiseks (Aplin, 2000). Õnnestunud embrüo implantatsiooniks on vaja terve embrüo ja vastuvõtliku endomeetriumi sünkroniseeritud molekulaarset dialoogi (Mahajan, 2015). Ebaõnnestunud implantatsiooni põhjuseks on 2/3 juhtudest mitteretseptiivne endomeetrium ning vaid 1/3 kordadest vigane embrüo (Lédée-Bataille jt., 2002; Simón jt., 1998).

Blastotsüsti kinnitumise aeg emaka limaskestale on piiratud. Nelja päeva pikkust perioodi, mil emaka limaskest on kõige vastuvõtlikum embrüo kinnitumiseks, nimetatakse implantatsiooniaknaks (WOI – *window of implantation*) (Harper, 1992). Implantatsiooniaken esineb regulaarse menstruaaltsükli 20. kuni 24. päeval, mis on 6-10 päeva pärast ovulatsiooni ning 7-11 päeva pärast LH eritumise maksimumi (Achache ja Revel, 2006). WOI langeb kokku progesterooni eritumise maksimumiga ning algab ja lõppeb vastavalt 6 ja 9-10 päeva pärast progesterooni taseme tõusu (Nikas, 2000). WOI on vastavuses embrüo arenguga – blastotsüst koorub ehk väljub teda ümbritsevast *zona pellucidast* 6 päeva pärast LH eritumise maksimumi ning on võimeline implanteeruma järgneva 24 tunni jooksul (Aplin jt., 2008).

Sekretoorse faasi jooksul läbib endomeetrium rea morfoloogilisi, biokeemilisi ning geneetilisi muutusi, et saavutada embrüo implanteerumiseks sobilikku funktsionaalset staatust implantatsiooniakna ajaks. Selline endomeetriumi remodelleerimine on juhitud peamiselt progesterooni, aga ka östrogeeni ning relaksiini poolt. Retseptiivset faasi kirjeldatakse kui transkriptsioonilist ärkamist, kuna retseptiivse staatuse omandamine sõltub paljude geenide ekspressiooni suurenemisest, kuid samuti ka repressioonist (Mahajan, 2015; Talbi jt., 2006).

Implantatsiooniprotsessi võib jagada kolme etappi – apositsioon, adhesioon ning invasioon. Molekulaarset dialoogi emakaõõnde jõudnud embrüo ning vastuvõtliku endomeetriumi vahel vahendavad erinevad munasarjahormoonide kontrolli all olevad molekulaarsed mediaatorid,

mille abil blastotsüst orienteerub emakaseina suhtes õigesse positsiooni ja saavutab esmase kontakti endomeetriumi epiteeliga (apositsioon), ning blastotsüsti trofoblasti rakud kinnituvad vastuvõtliku endomeetriumi luminaalsele epiteelile (adhesioon) (Enders ja Schlafke, 1969; Meseguer jt., 2001). Blastotsüst ankurdub strooma ekstratsellulaarsesse maatriksisse ning tungib endomeetriumi kihtidesse (invasioon) (Simón jt., 2001). On näidatud, et stroomarakud toetavad blastotsüsti kinnitumist, luues kaitsemehhanisme oksüdatiivse stressi vastu, samuti osalevad allogeense embrüo suhtes immunoloogilise tolerantsi tekkes (Weimar jt., 2013). Viljastumine vallandab endomeetriumis detsidualisatsiooniprotsessi, mille käigus ümbritsev strooma läbib rakulise transformatsiooni, et toetada embrüo kasvu ning invasiooni (Lim ja Wang, 2010). Luminaalsed epiteelirakud ekspresseerivad lokaalselt rakuadhesiooni retseptoreid ning ligande, mis soodustavad rakkudevahelise kontakti kujunemist ja ekstratsellulaarse maatriksiga seostumist (Lessey jt., 1992). Toimub veresoonte remodelleerimine – sekretsioonifaasi alguses moodustunud spiraalarterioolid muunduvad vähese takistuse ja suure mahtuvusega veresoonteks, mis kindlustavad tulevase platsentasse katkematu verevoolu (Whitley ja Cartwright, 2010).

### **1.3.3 Endomeetriumi vastuvõtlikkuse uuringud**

Endomeetriumi vastuvõtlikkuse uurimiseks on peamiselt kasutatud endomeetriumi täiskoe proove, kuid uuritud on ka endomeetriumi erinevaid rakupopulatsioone – peamiselt strooma (Bourdiec jt., 2013) ja epiteelirakke (Domínguez jt., 2003). Vähem on uuringuteks kasutatud endomeetriumi sekreeti (Boomsma jt., 2009, Bhusane jt., 2016), samuti on vastuvõtliku endomeetriumi iseloomustavaid markereid vaadeldud vereplasmas ja -seerumis (Bentin-Ley jt., 2011; Kresowik jt., 2014). Uuritavad proovid on kogutud nii tervete naiste loomuliku menstruaaltsükli erinevates ajapunktides (Mirkin jt., 2005; Sigurgeirsson jt., 2017), kontrollitud ovariaalse stimulatsiooni tsüklites (Simon jt., 2005) kui ka erinevate viljakust mõjutavate patoloogiatega, näiteks endometrioosiga, naistelt (Garcia-Velasco jt., 2015).

1950. aastal avaldasid Noyes jt histoloogilised kriteeriumid, mille abil saab endomeetriumi koeproovi morfoloogiliselt analüüsides määrata naise menstruaaltsükli faase ning hinnata endomeetriumi retseptiivsust, kuid praeguseks on meetodi täpsus retseptiivse staatuse määramisel ümber lükatud (Noyes jt., 1950; Coutifaris jt., 2004). Alternatiivina Noyes'i meetodile on leitud mitmeid molekule, mis on olulised vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel ning embrüo pesastumisel. Mutsiin 1 (MUC1) ning mutsiin 16 (MUC16) on endomeetriumi epiteelirakkude apikaalsel pinnal ekspresseeruvad glükoproteiinid, millel on oluline roll embrüo ja endomeetriumi esmasel adhesioonil (Gipson jt., 2008; Horne jt., 2005).

MUC1 tase saavutab progesterooni toimet maksimumi implantatsiooniakna ajal, kuid implantatsiooni toimumiseks peab MUC1 ekspressioon blastotsüsti implanteerumise korral kaduma kuna MUC1 kõrgelt ekspresseerivad rakud ei ole adhesiooniks võimelised (Brayman jt., 2007; Hey jt., 1994; Meseguer jt., 2001). MUC16 takistab blastotsüsti seostumist mitteretseptiivsele endomeetriumi ning on retseptiivses faasis alla reguleeritud (Gipson jt., 2008; Horne jt., 2005). Raku adhesioonimolekulid (CAM) – integriinid, selektiinid, kadheriinid ja immunoglobuliinid soodustavad adhesiooni kujunemist ja rakkude seostumist ekstratsellulaarse matriksiga. Neist uurituim on integriin  $\alpha\beta3$ , mille ligandid on esindatud nii embrüol kui endomeetriumi epiteelis.  $\alpha\beta3$  ekspressioon suureneb harilikult WOI ajal, kuid on viljatuse korral puudlik (Casals jt., 2012; Lessey jt., 1992, 1995). Hepariiniga seonduv epidermaalne kasvufaktor (HB-EGF) ja tema retseptor ErbB on samuti kõrgelt ekspresseeritud nii implantatsioonieelses embrüos kui ka endomeetriumi luminaalepiteelis ning nende seondumine on oluline embrüo ja endomeetriumi kahesuunalisel suhtlusel ja implantatsiooniprotsessi alustamisel (Davidson ja Coward, 2016; Hamatani jt., 2004; Nishi ja Klagsbrun, 2004). Leukeemiat inhibeeriv faktor (LIF) on enim uuritud tsütokiin endomeetriumis, mis mõjutab edukat implantatsiooni ja embrüo elulemust. LIF on oluline nii adhesiooni ja ka invasiooni etappides ankurdudes trofoblastidele ning reguleerides nende diferentseerumist (Dimitriadis jt., 2010; Lalitkumar jt., 2013; Tapia jt., 2008). Homeobox (*Hox*) geenid reguleerivad P4 ja E2 funktsioneerimist ja seeläbi on olulised endomeetriumi proliferatsioonil, diferentseerumisel ja retseptiivse staatuse kujunemisel. Nii *HOXA10* kui *HOXA11* mRNA-d on ekspresseeritud endomeetriumi epiteeli- ja stroomarakkudes ning nende ekspressiooni maksimum on sekretoorse faasi keskel, mis langeb kokku implantatsiooni ajaga ning P4 ja E2 kõrge tasemetega (Taylor jt., 1998, 1999).

Viimastel aastatel on vastuvõtliku endomeetriumi biomarkerite leidmise uuringud keskendunud peamiselt oomika-põhistele meetoditele – näiteks transkriptoomika, proteoomika, epigenoomika, metabooloomika ja lipidoomika. Endomeetriumi vastuvõtlikkuse uuringute puhul on oluline arvestada, et endomeetrium on reguleeritud tsükliliste hormoonide ning teiste faktorite poolt, mis on lisaks mõjutatud ka naise geneetilisest taustast ja ümbitsevast keskkonnast (Altmäe jt., 2014).

Ullah jt uurisid proteoomikapõhise analüüsiga östradioli taseme füsioloogilist mõju endomeetriumi rakkudele, et teha kindlaks, kas kontrollitud ovariaalse hüperstimulatsiooni puhul kasutatav kõrge östradioli tase mõjutab endomeetriumi retseptiivsust (Ullah jt., 2017). Hiljutises transkriptoomiuuringus analüüsiti mikrokiibi meetodiga IVF ravi läbinud patsientide endomeetriumi koeproove WOI ajal. Uuritavad olid jaotatud kahte gruppi – esimene oli

korduva implantatsioonihäirega (RIF – *recurrent implantation failure*) naiste grupp ning teistel oli õnnestunud IVF või ICSI esimese tsükliga. Gruppide vahel leiti 357 diferentsiaalselt ekspresseerunud mRNA-d. *AQP3*, *DPP4* ja *TIMP3* ekspressioon oli RIFiga naistel alla reguleeritud ning neid geene on ka varasemalt seostatud endomeetriumi retseptiivsuse häiretega RIF patsientidel (Shi jt., 2017a).

Endomeetriumi transkriptomiprofiili põhjal on töötatud välja ERA (*Endometrial Receptivity Array*) ehk endomeetriumi retseptiivsuse kiip, mis on molekulaardiagnostiline vahend endomeetriumi vastuvõtlikkuse staatuse määramiseks. ERA põhineb IGENOMIX'i poolt disainitud ja arendatud mikrokiibianalüüsil, kus patsiendi loomuliku tsükli LH+7 või hormonaalse asendusravi tsükli P + 5 päeval võetud endomeetriumi koeproovist määratakse transkriptsiooniprofiil (Díaz-Gimeno jt., 2011). Seda võrreldakse retseptiivsele endomeetriumile iseloomuliku profiiliga ning kategoriseeritakse proov kas retseptiivseks või mitteretseptiivseks. ERA testi on võimalik kasutada personaalse embrüo siirdamise aja määramiseks IVF ravi puhul. (Garrido-Gómez jt., 2013).

Lisaks eeltoodule on teada, et ka miRNA ekspressiooniprofiilid võivad sobida endomeetriumi vastuvõtlikkuse määramiseks. Selle kinnituseks on hiljutised uuringud näidanud miRNA-de olulisust endomeetriumi vastuvõtlikkuse kujunemisel (von Grothusen jt., 2014; Robertson jt., 2017).

#### **1.3.4 miRNAd ja endomeetriumi vastuvõtlikkus**

miRNA-de ekspressiooni endomeetriumis on uuritud menstruaaltsükli erinevates faasides ning endomeetriumi vastuvõtlikkusega on seostatud mitmeid miRNA molekule. Näiteks let-7, miR-30, miR-300 miRNA perekondade ja miR-17-92 klasteri liikmed, miR-494 ning miR-923 arvatakse reguleerivat geene, mis moduleerivad retseptiivse endomeetriumi kujunemist (Liu jt., 2016).

Altmäe jt. analüüsisid mikrokiibi põhiselt miRNA-de ekspressioonimustrit tervete naiste endomeetriumis menstruaaltsükli eelretseptiivses ning retseptiivses faasis ja tuvastasid neli miRNAd, mis olid oletatava implantatsiooni ajal spetsiifiliselt reguleeritud. Nad leidsid, et retseptiivses endomeetriumis on hsa-miR-30b ja hsa-miR-30d ekspressioon suurenenud, hsa-miR-494 aga vähenenud. Funktsionaalanalüüs näitas, et leitud miRNA-de sihtmärkgeenid on olulised transkriptsiooni regulatsioonis, rakkude proliferatsioonis ja apoptoosis, samuti reguleerivad p53, TGF- $\beta$ , ERK/MAPK ning Wnt signaaliradu retseptiivses endomeetriumis.

Varasemalt on näidatud kõigi nimetatud protsesside olulisust vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel (Altmäe jt., 2013).

Samuti on mikrokiipide põhiselt analüüsitud endomeetriumi miRNAde ekspressioonimustrit RIF patsientidel ning viljatutel patsientidel, kellel õnnestus kehaväline viljastamine esimeses ravitsükli (Shi jt., 2017b). Analüüsil selgus, et hsa-miR-145, hsa-miR-374, hsa-miR-4668-5p, hsa-miR-429 ning hsa-miR-5088 võivad olla seotud RIF patsientide madala endomeetriumi vastuvõtlikkusega.

Sekveneerimispõhine miRNAde ekspressiooniprofiili analüüs võimaldab avastada miRNAsid, mida inimese kudedes varasemalt kirjeldatud ei ole. Sekveneerimise abil on miRNAde ekspressiooniprofiili endomeetriumis määratud kahes töös (Sha jt., 2011; Sigurgeirsson jt., 2017). Sha jt kasutasid oma uurimuses endomeetriumi koeproove, mis olid kogutud IVF ravi läbivate naiste loomuliku menstruaaltsükli LH+2 ja LH+7 päevadel ning stimuleeritud tsükli neli ja seitse päeva pärast inimese kooriongonadotropiini (hCG) manustamist. Loomulikus menstruaaltsükli oli LH+7 faasis 20 miRNAd erinevalt ekspresseeritud võrrelduna LH+2 faasiga ning nende sihtmärkgeene analüüsides leiti, et need on samuti WOI ajal erineva ekspressioonimustriga. Näiteks miR-424 sihtmärkgeeniks ennustati sekreteeritud fosfoproteiin 1 (SPP1), mis interakteerudes oma retseptori integriin  $\alpha\beta3$ -ga on oluline embrüo adhesioonietapis (Apparao jt., 2001). Stimuleeritud tsükli leiti hCG+7 ja LH+7 gruppide võrdluses 22 erinevalt esindatud miRNAd. Varasemalt on näidatud, et östrogeeni ning progesterooni tasemed on hCG+7 vastavalt kolm ja kaks korda kõrgemad kui LH+7 faasis (Liu jt., 2008) ning seetõttu võib miRNAde muutunud ekspressioon olla põhjustatud kõrgeenenud hormoonide tasemetest ovariaalse stimulatsiooni protseduuril. Lisaks leiti, et miRNA ekspressiooniprofiil LH+7 päeval sarnaneb pigem hCG+4 päevale, mis viitab sellele, et ovariaalse stimulatsiooni tõttu on endomeetriumi küpsemine kiirem kui normaalses tsükli. Avastati ka 17 potentsiaalset miRNA kandidaatjärjestust (Sha jt., 2011).

Sigurgeirsson jt teised analüüsisid oma töös RNA sekveneerimise abil miRNAde ekspressiooniprofiili erinevusi tervete naiste WOI ning proliferatiivse faasi endomeetriumi biopsiates ja leidsid, et miR-449a, miR-449b ning miR-449c olid suurima ekspressioonierinevusega uuritavate gruppide vahel. Pakuti välja ka 30 varem annoteerimata miRNA järjestust, millest üks oli olulise ekspressioonierinevusega proliferatiivse faasi ning WOI vahel (Sigurgeirsson jt., 2017).

Hiljutised uuringud on näidanud, et implantatsiooniperioodi embrüo ja endomeetriumi vahelist kommunikatsiooni võivad reguleerida mikrovesiikulites olevad miRNAd, mis on



emakavalendikku sekreteeritud endomeetriumi ja tõenäoliselt ka embrüo poolt (Salamonsen jt., 2016).

Endomeetriumi retseptiivsusega seotud miRNAde uuringuid on seni avaldatud vähe ning avaldatud tööde tulemused pole omavahel kooskõlas, mistõttu on edasised uuringud antud teemal vajalikud.

## 2 EKSPERIMENTAALOSA

Käesolev töö on osa suuremast rahvusvahelisest (Eesti-Hispaania) uuringust NOTED (*Non-invasive Tests for Endometrial Dysfunction*), mille eesmärgiks on emaka limaskesta kvaliteeti mõjutavate faktorite analüüsimine ja uute viljatusravi diagnostikameetodite väljatöötamine. NOTED projekti üheks osaks on endomeetriumi vastuvõtlikkuse kujunemises osalevate miRNA ekspressioonitaseme muutuste määramine koest, samuti seda seisundit peegeldavate miRNA muutuste tuvastamine vereplasmast. Sellel eesmärgil sekveneeriti miRNAid tervete viljakate naiste eelretseptiivse (LH+2 tsükli päev) ja retseptiivse endomeetriumi (LH+8 tsükli päev) paarilistest koeproovidest (n=22 paari) ja samades ajapunktides kogutud vereplasma proovidest (n=9 paari). Samuti sekveneeriti miRNAid viljatuse diagnoosiga naise retseptiivse faasi ajaperioodil (LH+8) kogutud endomeetriumi (n=20) ja vereplasma (n=9) proovides. Raamatukogude ettevalmistamiseks kasutati *TruSeq Small RNA Library Preparation* komplekti (Illumina, USA), sekveneerimine toimus Illumina platvormil HiSeq 2500 ning viidi läbi Eesti Geenivaramu tuumiklaboris. Ekspressioonitasemete muutuste leidmiseks kasutati programmi R paketti *edgeR* (Robinson jt., 2010). Annoteerimata miRNAde analüüs endomeetriumi koest ning vereplasmast toimus miRDeep2 programmi abil (Friedländer jt., 2008). Tervete naiste endomeetriumi proovide andmeanalüüsil tuvastati LH+2 ja LH+8 ajapunktide vahel 233 statistiliselt oluliselt erineva tasemega miRNAid ( $FDR < 0.05$ ;  $FDR$  – *false discovery rate*), vereplasmast leiti samade ajapunktide võrdlusel 42 olulist miRNA taseme erinevust. Viljatute naiste ja tervete kontrollnaiste LH+8 päeva võrdlusel leiti endomeetriumi proovidest 187 ja vereplasmast neli statistiliselt olulist miRNA taseme ekspressioonierinevust. Kuna NOTED projekti tulemused on hetkel vormistamisel teadusartiklikaks ja veel avaldamata, siis ei esitata selles töös kõiki sekveneerimisel saadud andmete analüüsi tulemusi. Töö tulemuste osas on esitatud nende miRNAde andmed, mille ekspressioonierinevuste kinnitamine oli antud magistritöö ülesandeks.

## **2.1 TÖÖ EESMÄRGID**

Põhinedes NOTED projekti sekveneerimisandmete analüüsile oli käesoleva magistritöö eesmärkideks:

1. Kinnitada endomeetriumi koest ning vereplasmast detekteeritud miRNAde ekspressioonierinevusi, mis võivad mängida rolli vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel ja mida saaks kasutada biomarkerina vastuvõtliku endomeetriumi määramiseks.
2. Leida endomeetriumi koest ning vereplasmast seni annoteerimata miRNAsid, mis peegeldavad muutusi organismis endomeetriumi vastuvõtlikkuse ajal ning lisada uusi retseptiivse endomeetriumi kandidaatmarkereid.

## **2.2 MATERJAL JA METOODIKA**

### **2.2.1 Valimi ja töövoo kirjeldus**

Antud töös uuriti 12 terve reproduktiivses eas naise endomeetriumi biopsiaid ning 10 terve ja 10 viljatu naise vereplasmat. Uurimusse kaasatud naiste endomeetriumi biopsiad ning vereproovid koguti koostöös Nova Vita kliiniku, Elite kliiniku ning Lääne-Tallinna Keskhaiglaga. Terved uuritavad olid regulaarse menstruaaltsükliga ning loomulikult teel viljastunud ja sünnitanud vähemalt ühe lapse (mitte rohkem kui 10 a tagasi). Viljatute naiste gruppi kuulusid proovide kogumise perioodil kehavälise viljastamise tsükli läbivad patsiendid, kes olid nooremad kui 42 aastat ning kellel oli olnud vähemalt kolm ebaõnnestunud IVF viljatusravi tsükli. Nii terved kui viljatud naised polnud kolme kuu vältel kasutanud reproduktiivsüsteemi mõjutavaid hormoonpreparaate ning samuti kontrolliti, et uuritavatel ei esineks sugulisel teel levivaid haiguseid. Valimisse kuulunud naiste täpse ovulatsiooniaja määramiseks kasutati Baby Time (Zer Hitech, Iisrael) või Kaigert (Kaigert, EL) ovulatsiooniteste. Tervete naiste endomeetriumi koeproovid ning vereproovid koguti sama menstruaaltsükli kahes erinevas ajapunktis – vastavalt kaks (LH+2) ning kaheksa (LH+8) päeva pärast LH eritumise maksimumi ehk ovulatsioonitesti positiivseks muutumist (LH 0). Viljatute naiste vereproov võeti kaheksa päeva pärast LH eritumise maksimumi. Lisaks määrati kõigil uuritavatel LH+8 tsükli päeval vereseerumist normaalse menstruaaltsükli ning viljakusega seotud hormoonide tasemed (progesteron, prolaktiin, testosteroon, kilpnääret stimuleeriv hormoon ja suguhormoone siduv globuliin). Käesolevas töös kasutatud proovidest moodustati kolm võrdlusgruppi (Tabel 1):

- a) Tervete naiste endomeetriumi kude LH+2 ja LH+8
- b) Tervete naiste vereplasma LH+2 ja LH+8

c) Tervete naiste vereplasma LH+8 ja viljatute naiste vereplasma LH+8

NOTED projekti raames teostatud eksperimentaalse osa skeem miRNAde erinevuse määramiseks uuritavate gruppide vahel on kujutatud joonisel 4.

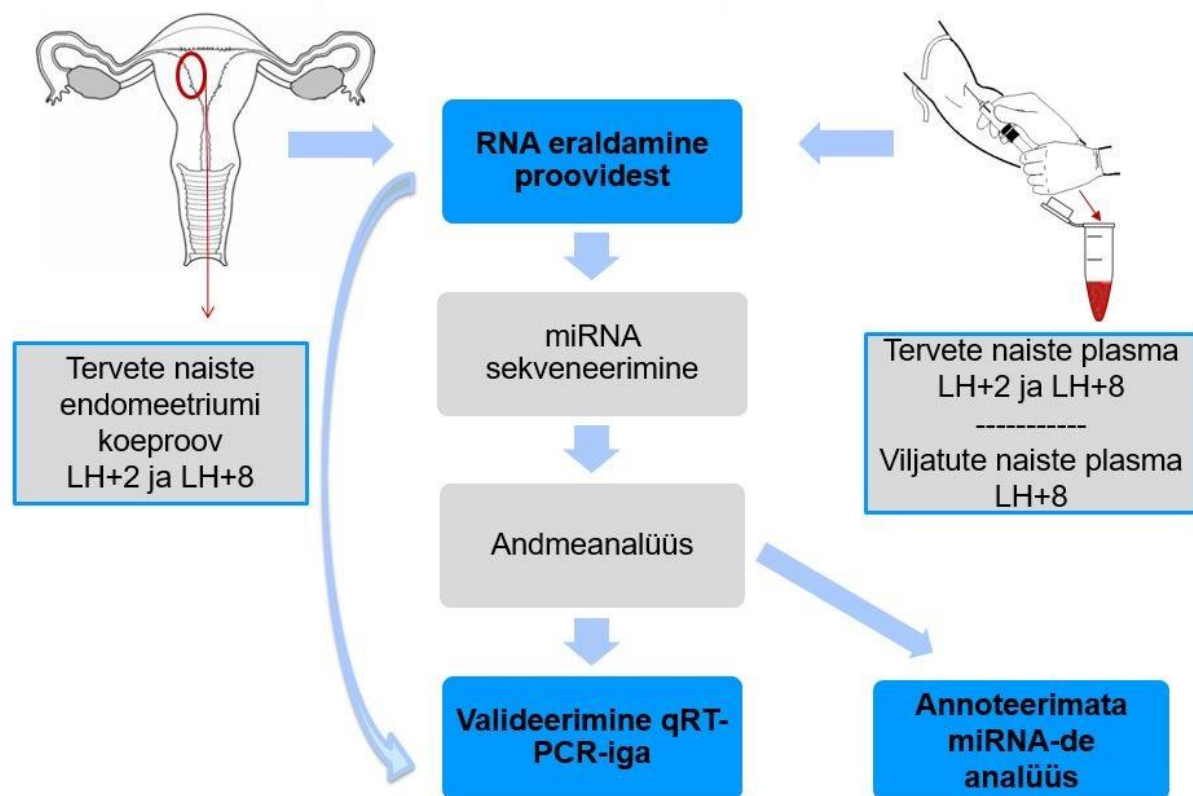
**Tabel 1.** Võrdlusgruppide jaotus ning uuritavate kliinilised andmed.

	Terved naised (endomeetriumi kude)		Terved naised (vereplasma)		Viljatud naised (vereplasma)
	LH+2	LH+8	LH+2	LH+8	LH+8
<b>Proovi võtmise ajapunkt</b>					
<b>Valimi suurus</b>	12+12		10+10		10
<b>Vanus (a)</b> Keskmine $\pm$ SD	31,5 $\pm$ 3,2		29,9 $\pm$ 2,6		37,7 $\pm$ 2,8
<b>KMI (kg/m<sup>2</sup>)</b> Keskmine $\pm$ SD	23,2 $\pm$ 3,1		23,2 $\pm$ 2,9		23,1 $\pm$ 2
<b>Suitsetajaid</b>	0		1		0

KMI – kehamassiindeks; SD – standardhälve

Endomeetriumi biopsiate võtmiseks kasutati Pipelle (Laboratoire CCD, Prantsusmaa) kateetrit ning biopsiatele teostati histoloogiline analüüs, et kontrollida koeproovide vastavust menstruaaltsükli faasile. Veeniveri koguti EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat) katsutisse, mida vereplasma eraldamiseks tsentrifuugiti 1600  $\times$  g juures 10 minutit. Seejärel kanti pealmine vereplasma fraktsioon uude puhtasse tuubi ning tsentrifuugiti 10 minutit 16 000  $\times$  g. Mõlemad tsentrifuugimised teostati 4 °C juures. Vereplasma ning endomeetriumi koeproovid säilitati RNA eraldamiseni -80 °C juures. Endomeetriumi koeproove hoiti spetsiaalses RNAd säilitavas *RNAlater*® (Thermo Fisher Scientific, USA) lahuses.

Antud uurimistöö tehti Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee kooskõlastusel ning uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusoleku vormi uuringus osalemiseks.



**Joonis 4. Töövoo kirjeldus.** Antud magistritöö raames teostatud eksperimentaalsed tööd on välja toodud sinisel taustal: bioloogilisest materjalist miRNA eraldamine ja kvantitatiivse reaalka-PCR (qRT-PCR) meetodil endomeetriumi koest ning vereplasmast miRNAde määramine. Samuti teostas miRNAde sekveneerimisandmete põhjal annoteerimata miRNAde analüüsi. LH – luteiniseeriv hormoon. (Kasutatud pildid: [goo.gl/7qJOka](http://goo.gl/7qJOka), [goo.gl/lcFJ4G](http://goo.gl/lcFJ4G), 2017).

### 2.1.1 RNA eraldamine

RNA eraldamiseks endomeetriumi koeproovidest ning vereplasmast kasutati *miRNeasy Mini* või *miRNeasy Micro* komplekte (Qiagen, Saksamaa). Komplektides on loomsetest kudedest ja rakkudest RNA eraldamiseks kombineeritud fenooli ning guanidiin-tiotsüanaati sisaldava QIAzoli põhine lüüs ja ränimembraaniga eralduskoloni kasutamine. QIAzol aitab kaasa kudede ning RNAasi lagundamisele, ning on efektiivne valkude denatureerija. Eraldatud RNA proovid säilitati -80 °C juures.

*RNA eraldamine endomeetriumi koeproovidest.* miRNA eraldamiseks kasutati ~30 mg endomeetriumi kudet, mis homogeniseeriti 30 sekundit 700 µl QIAzoli lüüsilahuses kasutades *TissueRuptor*® (Qiagen, Saksamaa) rootor-staator homogenisaatorit. Homogenaati inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit, seejärel lisati proovile 140 µl kloroformi ning segati 15 sekundit ja inkubeeriti taas toatemperatuuril 3 minutit. Järgnev RNA eraldamine viidi läbi *miRNeasy Mini Kit* tootjapoolse protokolliga alusel. Puhastatud miRNA elueeriti kolonnist 14 µl RNAasivaba

veega. miRNA puhtust kontrolliti ning kontsentratsiooni mõõdeti NanoDrop 2000 spektrofotomeetri abil (Thermo Fisher Scientific, USA).

*RNA eraldamine vereplasma proovidest.* RNA eraldamiseks kasutati 0,2 ml vereplasmat, mis segati QIAzoli lüüsilahusega vahekorras 1:5 ning inkubeeriti 5 minutit. Seejärel lisati vereplasma algmahus kloroformi, proove segati 15 sekundit ning inkubeeriti toatemperatuuril 3 minutit. Järgnevad etapid viidi läbi *miRNeasy Micro Kit* plasma RNA eralduse protokollil alusel. RNA elueerimiseks kolonnist kasutati 14 µl RNAasivaba vett.

## **2.2.2 miRNAde ekspressioonitaseme määramine**

### ***2.2.2.1 Uuritavad miRNAd***

Uuritavad miRNAd ning referentsgeenid valiti välja tuginedes NOTED projekti sekveneerimise tulemustele. Uuritavate miRNAde ekspressioonitaseme normaliseerimiseks kasutatavate referents-miRNAde valimisel lähtuti sellest, et nende ekspressioon oleks võrreldavate gruppide kõikides proovides ühtlase tasemega. Vereplasma grupi referentside valimisel arvestati ka, et täisveres ei oleks valitud miRNAd kõrgelt ekspresseeritud, sest sellisel juhul on nende tase väga sõltuv vererakkude arvukusest ning hemolüüsist. Menstruaaltsükli faaside (LH+8 vs LH+2) vahelise ning tervete ja viljatute naiste vahelise miRNAde ekspressioonitaseme erinevuse valideerimiseks kasutati käesolevas töös kvantitatiivse reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni meetodit (qRT-PCR).

### ***2.2.2.2 Endomeetriumi koeproovid***

Endomeetriumi koest valiti valideerimiseks välja järgnevad miRNAd: miR-141-3p (sekveneerimisanalüüsi tulemus: erinevus kordades ( $FC - fold\ change$ ) = 3,7;  $FDR = 8,7 \times 10^{-37}$ ), miR-200a-3p ( $FC = 1,8$ ;  $FDR = 6,1 \times 10^{-8}$ ), miR-449a ( $FC = -2,7$ ;  $FDR = 1,3 \times 10^{-10}$ ) ning miR-21-5p ( $FC = 1,5$ ;  $FDR = 2,3 \times 10^{-9}$ ). Referentsina kasutati miR-151a-5p ja miR-196b-5p. miRNA ekspressioonitasemete määramiseks kasutati TaqMan süsteemi. miRNA põhjal sünteesiti üheaahelaline cDNA pöördtranskriptsiooni reaktsiooni abil kasutades *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription* komplekti vastavalt tootja protokollile. Iga uuritava miRNA tuvastamiseks lisati reaktsioonisegusse spetsiifiline *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription* praimer (Applied Biosystems, USA). Pöördtranskriptsiooni reaktsioonisegu koostis on tabelis 2 ning süntees viidi läbi Aeris™ termotsükleris (Esco, Singapur) kasutades järgmist programmi: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, kohene jahutamine 4 °C-ni. cDNA säilitati edaspidiseks kasutamiseks -20 °C juures.

**Tabel 2.** cDNA sünteesi reaktsioonisegu koostis endomeetriumi proovidega katsetes.

Reaktsioonisegu komponent	1× segu (µl)
10× reaktsioonipuhver	1.5
dNTP segu (100mM)	0.15
RNAasi inhibiitor	0.19
Multiscribe RT ensüüm	1
Nukleaasivaba vesi	8.76
RNA (25 ng/µl)	0.4
RT praimer	3
Kogumaht	15

Endomeetriumi miRNAde ekspressiooni mõõtmiseks kasutati iga uuritava miRNA ning referentsi jaoks spetsiifilist *TaqMan MicroRNA Assay*’d ja *TaqMan 2x Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG* segu (Applied Biosystems, USA) vastavalt tootja protokollile. qRT-PCR reaktsioonisegu ning kasutatud *assay*’d on toodud tabelites 3 ja 4. Kõik reaktsioonid teostati PCR plaadil lõppmahus 20 µl ning viidi läbi kahes korduses. Reaktsioonide läbiviimiseks kasutati ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, USA) masinat ning järgnevat programmi: aktivatsiooni etapp 15 min 95 °C, seejärel 40 tsüklit: 15 sek 95 °C ja 1 min 60 °C.

**Tabel 3.** qRT-PCR reaktsioonisegu koostis endomeetriumi proovidega katsetes.

Reaktsioonisegu komponent	1× segu (µl)
TaqMan 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	10
TaqMan Micro RNA Assay (20×)	1
cDNA	1,33
ddH <sub>2</sub> O	7,67
Kogumaht	20

**Tabel 4.** Töös kasutatud TaqMan MicroRNA Assay'd.

Uuritav grupp	Assay number	miRNA nimi	Järjestus
Endomeetriumi kude LH+2 ja LH+8	000397	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
	000502	hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
	000463	hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG
	001030	hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
	002215	<b>hsa-miR-196b-5p</b>	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG
	002642	<b>hsa-miR-151-5p</b>	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU

Referentsina kasutatud miRNAd on välja toodud tumedas kirjas.

### 2.2.2.3 Vereplasma proovid

Vereplasma proovidest eraldatud miRNAde ekspressioonitaseme määramiseks kasutati *miRCURY LNA<sup>TM</sup> Universal RT microRNA PCR* protokoll (Exiqon, Taani). Antud süsteemi eripäraks on universaalne pöördtranskriptsioon, sellele järgneb reaalaaja-PCR põhine amplifikatsioon LNA rikastatud praimeritega. Vereplasmast valiti valideerimiseks miR-885-5p (FC = -4,5; FDR =  $8 \times 10^{-5}$ ), miR-6803-3p (FC = -2,9; FDR =  $3 \times 10^{-4}$ ), miR-483-3p (FC = -3,8; FDR =  $4 \times 10^{-4}$ ), miR-193b-5p ning miR-4662a-5p (FC = 2,1; FDR = 0,02), mis kuulusid 30 suurima ekspressioonierinevusega miRNAde hulka LH+2 ja LH+8 gruppide võrdluses. Viljatute naiste LH+8 ning tervete naiste LH+8 võrdlusgrupi puhul valiti valideerimiseks miR-5684 (FC = -4,8; FDR = 0,001). Vereplasmast eraldatud miRNA-de puhul kasutati referentsina miR-3615, miR-106b-3p, miR-501-3p.

miRNA üheaaheliseks cDNA-ks transkribeerimiseks kasutati *Universal cDNA synthesis kit II* komplekti (Exiqon, Taani). Teostati ka cDNA sünteesi optimeerimise etapp, kus katsetati reaktsioonisegus 2, 4 ning 6 µl RNA-d. Kuna mõned uuritavad miRNAd olid qRT-PCRi detektsiooni piiril, prooviti reaktsioonisegus Exiqoni soovitatud 40× cDNA lahjenduse asemel ka 15× lahjendust. Optimeerimise tulemusena kasutati edasistes katsetes cDNA sünteesiks 6 µl RNA-d ning cDNA puhul 40× lahjendust. cDNA sünteesi reaktsioonisegu koostis on toodud tabelis 5. Pöördtranskriptsiooni reaktsioon toimus 42°C juures 60 minutit, reaktsioon peatati pöördtranskriptaasi inaktiveerimisega 95 °C juures 5 minuti jooksul millele järgnes kohene jahutamine jääl. Süntees viisi läbi Aeris<sup>TM</sup> termotsükleris (Esco, Singapur) ning cDNA säilitati -20 °C juures.

**Tabel 5.** cDNA sünteesi reaktsioonisegu koostis vereplasma proovidega katsetes.

Reaktsioonisegu komponent	1× segu (µl)
5× reaktsioonipuhver	2
Nukleaasivaba vesi	0.5
Ensüümisegu	1
Spike-in	0.5
RNA	6
Kogumaht	10

qRT-PCR teostamiseks kasutati *ExiLENT SYBR® Green master mix* segu ning LNA PCR praimereid (Exiqon, Taani), mille järjestused on toodud tabelis 7. Reaktsioonisegu valmistamisel järgiti tootja protokoll (Tabel 6). ROX referentsvärvi (Solis BioDyne, Eesti) lõppkontsentratsioon oli qRT-PCR reaktsioonis 50 mM.

**Tabel 6.** qRT-PCR reaktsioonisegu koostis vereplasma proovidega katsetes.

Reaktsioonisegu komponent	1× segu (µl)
2× ExiLENT SYBR® Green master mix	5
cDNA 40× lahjendus + ROX (0.1 mM)	4
LNA™ PCR praimer	1
Kogumaht	10

Kõik reaktsioonid tehti kolmes korduses ning ühe reaktsiooni maht PCR plaadi kaevus oli 10 µl. qRT-PCRi viidi läbi ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, USA) masinaga kasutades järgnevat programmi:

Polümeraasi aktiveerimine	95°C	10 min	} 40 tsüklit
Denaturatsioon	95°C	10 sek	
Praimerite seondumine, amplifikatsioon	60°C	1 min	



Jahutuskiiruseks oli 1,6 °C/s ning qRT-PCRi eksperimendi lõpus teostati ka dissotsiatsiooniprotokoll, kus määrati tekkinud produktide dissotsiatsiooni- ehk sulamistemperatuurid ( $T_m$ ), mille abil on võimalik kontrollida PCR praimerite spetsiifilisust.

**Tabel 7.** Töös kasutatud LNA™ PCR praimerid.

Uuritav grupp	Praimeri number	miRNA nimi	miRNA järjestus
Vereplasma LH+2 ja LH+8	204473	hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
	2115732	hsa-miR-6803-3p	UCCCUCGCCUUCUCACCCUCAG
	204012	hsa-miR-483-3p	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU
	2115325	hsa-miR-4662a-5p	UUAGCCAAUUGUCCAUCUUUA
	204065	hsa-miR-193b-5p	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA
	2106599	<b>hsa-miR-3615</b>	UCUCUCGGCUCCUCGCGGCUC
	204020	<b>hsa-miR-106b-3p</b>	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC
	204178	<b>hsa-miR-501-3p</b>	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUCU
Vereplasma terved ja viljatud	2106564	hsa-miR-5684	AACUCUAGCCUGAGCAACAG

Tumedas kirjas on tähistatud mõlemas uuritavas grupis referentsina kasutatud praimerid.

### 2.2.3 qRT-PCR andmete analüüs

Uuritavate miRNAde ekspressioonitaseme suhteliseks kvantiseerimiseks kasutati *cycle threshold* (Ct) ehk võrdleva lävitsükli meetodit, mis põhineb fluorestsentsi intensiivsuste erinevustel kontrollproovide ning uuritavate proovide vahel. Lävitsükliks nimetatakse PCR-i tsükli arvu, kus fluorestsentsi signaal ületab lävitaseme (*threshold*) – mida rohkem on kvantiseeritavat miRNAd, seda kiiremini toimub kaheaahelalise produkti süntees ning seda varasemas tsükli ületatakse lävi. Kuna kudedest eraldatud miRNAde põhjal sünteesitud cDNA tase on erinev, toimub läve ületamine erinevates tsüklikes. Antud töös määrati lävitasemeks 0,2. Uuritavate miRNAde amplifikatsiooni Ct väärtused normaliseeriti referents-miRNAde keskmise Ct väärtuse suhtes:

$$\Delta Ct = \text{keskmine Ct (uuritav miRNA)} - \text{keskmine Ct (referents miRNA)},$$

kus  $\Delta C_t$  näitab miRNA suhtelist ekspressiooni väärtust. miRNAde suhtelise ekspressiooni erinevus uuritavate gruppide vahel arvutati  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  valemit kasutades (Livak ja Schmittgen, 2001), mis väljendab miRNAde ekspressioonitasemete muutust kordades.  $\Delta\Delta C_t$  leidmiseks kasutasime järgmist valemit:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{uuritav grupp } x) - \Delta C_t(\text{uuritav grupp } y)$$

Antud valemis tähistavad x ja y uuritavaid gruppe vastavalt sellele, milliste gruppide vahelisi erinevusi analüüsiti, näiteks vereplasma LH+2 võrrelduna LH+8 miRNA ekspressiooniga.

miRNA ekspressioonitasemete võrdlemiseks kasutati tervete naiste andmete puhul kahesuunalist paaris ning tervete ja viljatute naiste andmete võrdlusel kahesuunalist paaritut t-testi, mis teostati kasutades MS Excel 2016 programmi (Microsoft Software, USA). Ekspressioonitasemete erinevused loeti statistiliselt oluliseks, kui p-väärtus < 0,05. Korrelatsioonanalüüs uuritavate vanuse ja miRNAde tasemete vahel teostati vabavaralise statistikaprogrammiga R (versioon 3.3.1, R Core Team, 2016) mida kasutati ka jooniste tegemisel.

#### **2.2.4 Annoteerimata miRNAde analüüs**

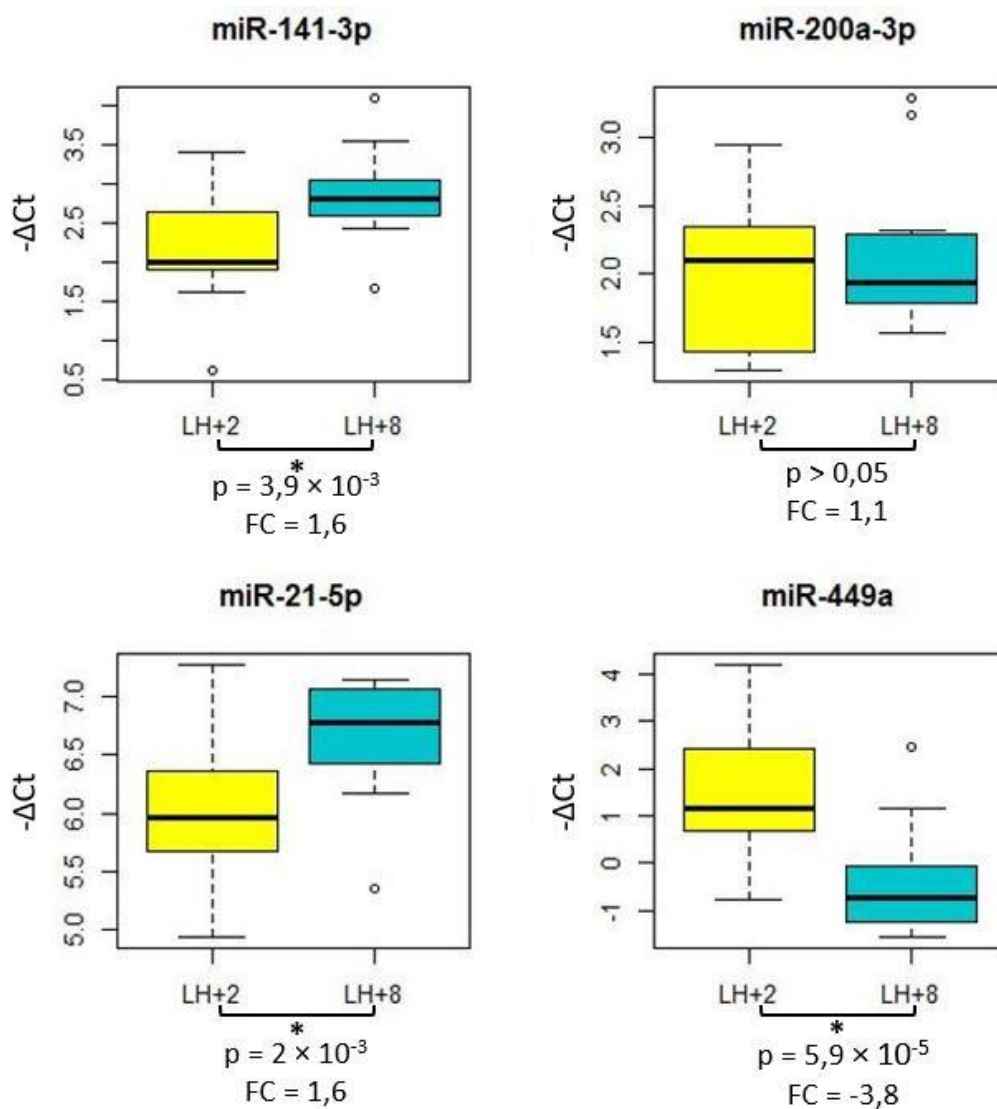
Antud magistritöö raames vaadeldi miRDeep2 poolt ennustatud annoteerimata miRNAid nii tervete kui viljatute naiste endomeetriumi ja plasmaproovidest – kokku oli 30 tervete naiste LH+2 proovi, 34 tervete naiste LH+8 proovi ning 27 viljatute naiste proovi. Potentsiaalseteks senikirjeldmata miRNAdeks kaaluti järjestusi miRDeep skooriga  $\geq 5$ . Kõik kandidaat-miRNAid võrreldi BLASTn abil (*Basic Local Alignment Search Tool nucleotide-nucleotide*) (Zhang jt., 2000) GenBank andmebaasis olevate järjestustega, et välistada eelnevalt annoteeritud miRNAde, erinevate mittekodeerivate RNA molekulide (tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, siRNA, exRNA, piRNA, scaRNA, lncRNA) ning mRNA fragmentide arvamist uute miRNAde hulka..

### **2.3 TULEMUSED**

#### **2.3.1 Uuritavate miRNAde ekspressioonitaseme erinevuse valideerimine tervete naiste LH+2 ja LH+8 endomeetriumis**

miRNA sekveneerimisandmete põhjal valisime valideerimiseks välja neli miRNAid ning uurisime nende ekspressiooni tervete patsientide endomeetriumi koes LH+2 (n=12) ja LH+8 (n=12) tsükli päeval. Selgus, et neljast uuritavast miRNAst kolmel – miR-449a, miR-21-5p ja miR-141-3p olid ekspressioonitasemed menstruaaltsükli LH+8 päeval statistiliselt erinevad

võrreldes LH+2 päevaga. Samuti oli ekspressiooni regulatsiooni suund kooskõlas sekveneerimisandmetega. miR-200a-3p korral aga statistiliselt olulist erinevust uuritavate gruppide vahel ei esinenud (Joonis 5).

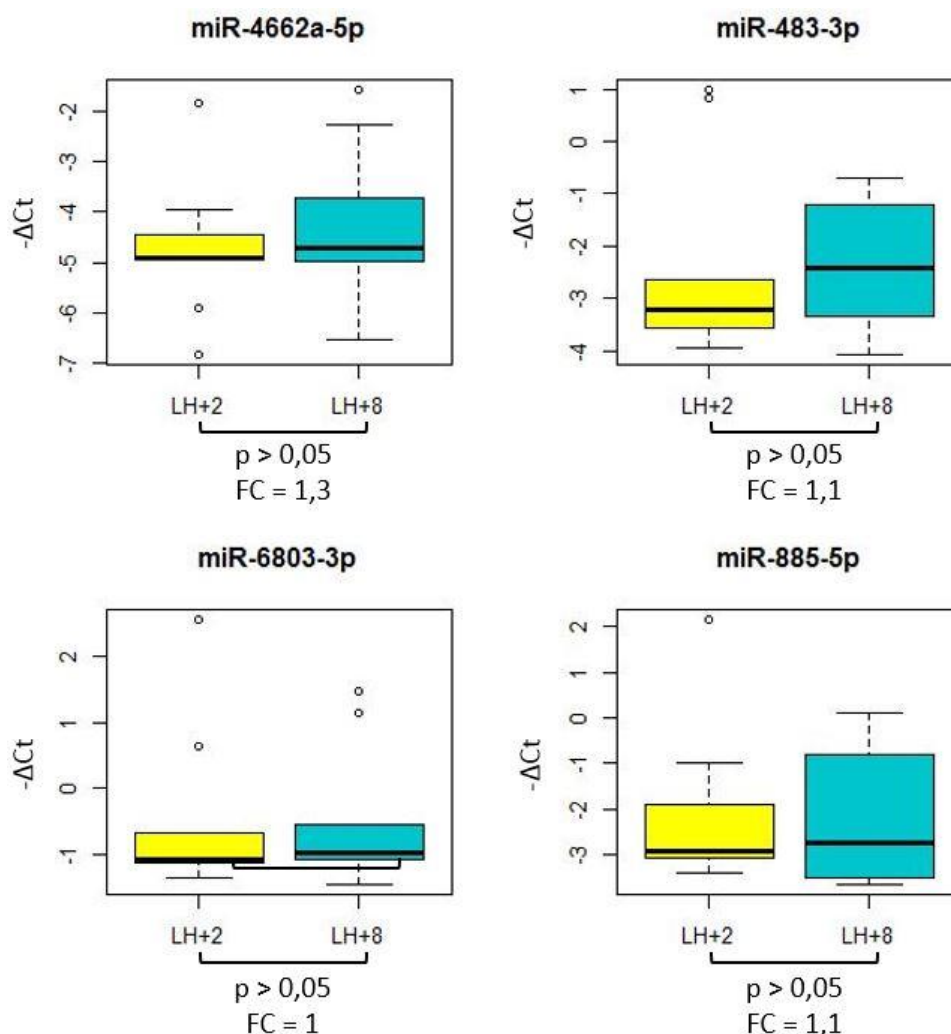


**Joonis 5.** Endomeetriumi koest detekteeritavate miRNA-de suhtelised ekspressioonitasemed ( $\Delta C_t$ ) tervete naiste menstruaaltsükli LH+2 (kollane) ja LH+8 (sinine) päevadel. Selleks, et madalam  $C_t$  väärtus vastaks kõrgemale miRNA tasemele korrutasime illustratiivsel eesmärgil  $\Delta C_t$  väärtused -1-ga. Erinevus kordades (FC) näitab miRNA ekspressiooni erinevust LH+8 päeval võrrelduna LH+2 päevaga.

### 2.3.2 Uuritavate miRNAde ekspressioonitaseme erinevuse valideerimine tervete naise vereplasmas

Vereplasmast valiti valideerimiseks miR-193b-5p, miR-4662a-5p, miR-483-3p, miR-6803-3p ning miR-885-5p, mille ekspressiooni uuriti tervete naiste menstruaaltsükli LH+2 (n=10) ja

LH+8 (n=10) päevadel. Referentsina kasutati miR-3615, miR-106b-3p ja miR-501-3p. miR-3615 ja miR-193b-5p ekspressioonitase oli analüüsimiseks liiga madal ning jäeti seetõttu hilisemas tulemuste analüüsis välja. Dissotsatsioonianalüüsi sulamistemperatuuride põhjal võib oletada, et miR-193b-5p puhul ei olnud kasutatav LNA PCR praimer antud miRNA-spetsiifiline. Samuti eemaldati tulemuste analüüsist ühe uuritava LH+2 ning LH+8 ekspressiooniandmed, kuna kordustevaheline kõikumine referents-miRNAde puhul oli suur. Lõppanalüüsi jäi kaks referents-miRNA-d, neli uuritavat miRNA-d ning üheksa naise plasma LH+2 ja LH+8 ajapunktide ekspressiooniandmed. qRT-PCR tulemusena leiti, et ükski uuritav miRNA ei näidanud tervete naiste LH+8 ja LH+2 tsükli päevade võrdluses olulist ekspressioonierinevust (Joonis 6).

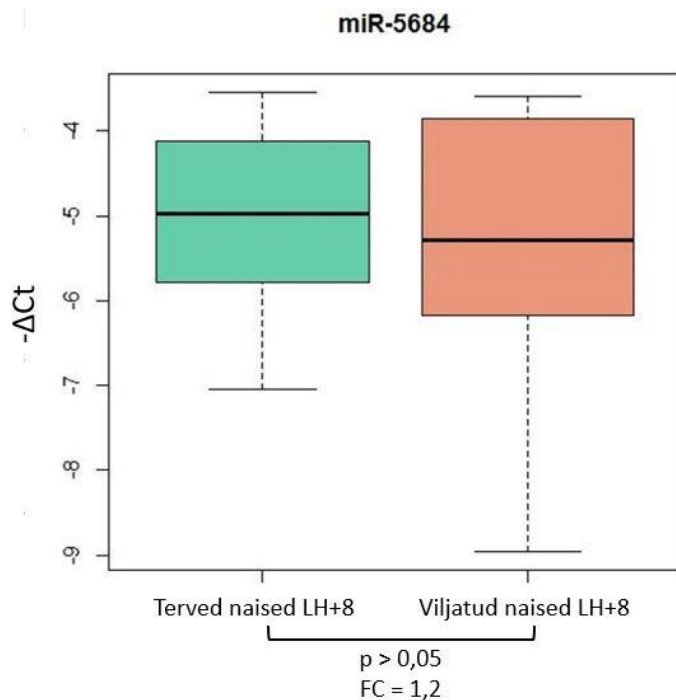


**Joonis 6.** Vereplasmast detekteeritavate miRNA-de suhtelised ekspressioonitasemed ( $\Delta Ct$ ) tervete naiste menstruaaltsükli LH+2 (kollane) ja LH+8 (sinine) päevadel. Selleks, et madalam Ct väärtus vastaks kõrgemale miRNA tasemele korrutasime illustratiivsel eesmärgil  $\Delta Ct$  väärtused -1-ga. Erinevus kordades (FC) näitab miRNA ekspressiooni erinevust LH+8 päeval võrrelduna LH+2 päevaga.

### **2.3.3 Uuritavate miRNAde ekspressioonitaseme erinevuse valideerimine viljatute ja tervete naiste vereplasmas**

Antud grupis valiti valideerimiseks välja miR-5684, mille ekspressiooni uuriti tervete naiste menstruaaltsükli LH+8 (n=10) ning viljatute naiste LH+8 (n=10) päevadel. Referentsina kasutati miR-3615, miR-106b-3p ja miR-501-3p. miR-3615 jäeti tulemuste analüüsimisel referentside grupist välja, kuna selle ekspressioonitase oli madal sarnaselt tervete naiste vereplasma grupiga. Lisaks eemaldati referentside qRT-PCR reaktsioonide kordustevahelise kõikumise tõttu tervete naiste ja viljatute naiste grupist ühe indiviidi andmed. Seega analüüsiti kokku üheksa terve ning üheksa viljatu naise vereplasma miRNAde ekspressioonitasemeid. Analüüsi tulemusena leiti, et kuigi tervetel naistel on miR-5684 ekspressioon tsükli LH+8 päeval madalama ekspressiooniga võrreldes viljatute naistega, siis statistiliselt olulist erinevust ei ilmnunud ( $p = 0,74$ ) (Joonis 7).

Uuritud viljatute patsientide ning tervete naiste keskmised vanused olid oluliselt erinevad: viljatuse diagnoosiga naised olid oluliselt vanemad kui terved naised ( $p = 0,0004$ ). Uurimaks, kas vanuse ning miR-5684 või kasutatud referentsgeenide ekspressioonitaseme vahel on oluline seos, teostasime Spearmani korrelatsioonianalüüsi. Analüüs vanuse ja miR-5684 ekspressioonitaseme vahel olulist seost ei näidanud ( $\rho=0,4$ ;  $p$ -väärtus  $> 0,05$ ) ning edasistes analüüsides uuritavate vanust arvesse ei võetud. Samuti ei leitud korrelatsiooni kasutatud referents-miRNAde tasemete ja vanuse vahel (miR-501-3p:  $\rho=0,2$ ;  $p$ -väärtus  $> 0,05$ ; miR-106b-3p:  $\rho=0,2$ ,  $p$ -väärtus  $> 0,05$ ).



**Joonis 7.** Vereplasmast detekteeritava miR-5684 suhteline ekspressioonitase ( $\Delta C_t$ ) tervete naiste menstruaaltsükli LH+8 (sinine) ja viljatute naiste LH+8 (oranz) päeval. Selleks, et madalam  $C_t$  väärtus vastaks kõrgemale miRNA tasemele korrutasime illustratiivsel eesmärgil  $\Delta C_t$  väärtused -1-ga. Erinevus kordades (FC) näitab miRNA ekspressiooni erinevust tervetel naistel võrrelduna viljatute naistega.

### 2.3.4 Annoteerimata miRNAd

Potentsiaalseid senikirjeldamata miRNAsid analüüsisime sekveneerimisandmete põhjal 63 endomeetriumi proovist ning 29 plasmaproovist. Pärast annoteerimata miRNAde prekursor-järjestuse võrdlemist BLASTn abil GenBank andmebaasis olevate järjestustega jäi alles 242 seni kirjeldamata kandidaat-miRNAd. Endomeetriumi koeproovidest leidsime 41 annoteerimata miRNAd, millest 25 olid esindatud vaid ühe patsiendi proovis ja 16 kahes proovis. Kaheksa miRNAd olid esindatud vähemalt viie uuritava proovides (Tabel 8). Nendest neli oli esindatud vaid LH+8 proovides ning kaks enamjaolt LH+8 proovides. Ühtegi vaid LH+2 proovides esinevat miRNAd ei leitud, samuti ei olnud miRNAsid, mis oleks ekspresseeritud vaid tervetel või viljatutel patsientidel.

Vereplasmas tuvastasime 38 annoteerimata miRNAd, millest 22 olid esindatud vaid ühe uuritava proovis ja 16 kahes proovis. Lisaks olid kolm miRNAd esindatud vähemalt viie patsiendi proovides, millest kaks esines ainult tervetel uuritavatel (Tabel 9). Ühtegi vaid LH+2 või LH+8 faasis ekspresseeruvat ja viljatute naiste spetsiifilist miRNAd ei tuvastatud.

Endomeetriumi ja plasmaproovide võrdlusel leidsime kolm ühist miRNAd, millest üks oli ekspresseeritud vaid LH+8 proovides.

**Tabel 8.** Annoteerimata miRNAd endomeetriumis (esindatud vähemalt 5 proovis).

Küpse miRNA konsensusjärjestus	Keskmine miRDeep2 skoor	Keskmine lugemite arv	Esindatus LH+2 proovides (n)	Esindatus LH+8 proovides (n)	Prekursor järjestuse koordinaat genoomis	Asukoht
gaaaaagucauggaggc	44.2	98	0	5	chr1:567994..568065:-	Intergeenne
uccaacguggauacacccgggagg	93	186.3	0	6	chr1:28833876..28833930:+	OPRD1 geeni intron
gaacacugaaguuaauggc	5.4	40.6	1	31	chr2:85935688..85935758:+	Intergeenne
aucugaaauugaaauggucc	7.4	9.7	0	6	chr2:46575932..46576010:+	RHOQ intronis
uuauccuccaguagacuaggga	33.9	61.8	9	7	chr8:99405894..99405952:-	VPS13B intronis
uuagggcccgucuccauc	5.5	31.3	14	28	chr10:135055628..135055714:+	Intergeenne
uuguggguuuuguuaa	56.6	122.1	3	12	chr16:58762525..58762567:-	Intergeenne
aaaaacugugauacuuuugca	16.1	17.2	0	5	chr17:37453672..37453731:+	TADA2A geeni intronis

**Tabel 9.** Annoteerimata miRNAd vereplasmas (esindatud vähemalt 5 proovis).

Küpse miRNA konsensusjärjestus	Keskmine miRDeep2 skoor	Keskmine lugemite arv	Esindatus LH+2 proovides (n)	Esindatus LH+8 proovides (n)	Prekursor järjestuse koordinaat genoomis	Asukoht
agccuccagucuggccugag	6.8	6.4	2	3	chr1:55784364..55784416:+	Intergeenne
cgccgcuuucugggcucgcucac	6.1	8	1	4	chr5:108084334..108084392:-	FBXL17 geeni intron
gcggcgggcgggcgggcgggcgggcg	45.3	84.6	4	3	chrX:101186814..101186876:-	Intergeenne



## 2.2 ARUTELU

Käesoleva töö raames uuriti endomeetriumi koest ning vereplasmast miRNAsid, mis võivad mängida rolli vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel ning mida saaks kasutada biomarkerina retseptiivse endomeetriumi määramiseks. Katsete tulemusena selgus, et tervete uuritavate endomeetriumi koes oli miR-21-5p ja miR-141-3p tase menstruaaltsükli LH+8 päeval oluliselt kõrgem ning miR-449a tase oluliselt madalam võrreldes LH+2 päevaga.

miR-449a ekspressioonimuutusi on varasemalt kirjeldatud veise endomeetriumis (Ponsuksili jt., 2014), inimese endomeetriumi adenokartsinoomi puhul (Wu jt., 2009) ja IVF ravi läbivate naiste endomeetriumis (Shi jt., 2017b). miR-449 perekond osaleb apoptoosi, rakutsükli peatamise ning raku diferentseerumise indutseerimisel (Lizé jt., 2011). Apoptoos on endomeetriumis implantatsiooniprotsessil väga oluline embrüo invasioonietapil, kus endomeetriumi epiteel lagundatakse (Boeddeker ja Hess, 2015).

Hiljuti avaldatud uuringus analüüsiti RNA sekveneerimise abil tervete naiste proliferatiivse ja sekretoorse menstruaaltsükli faasi endomeetriumi proove, et mõista, missugused muutused toimuvad endomeetriumis ühest faasist teise minekul (Sigurgeirsson jt., 2017). Uuringu tulemusena leiti, et miR-449a kuulus kolme kõige suurema ekspressioonierinevusega snRNA hulka ning oli implantatsiooniakna ajal kõrgema tasemega võrreldes proliferatiivse faasi endomeetriumiga. Meie uurimuses oli miR-449a ekspressioonimuutus vastupidise suunaga. Regulasioonisuuna erinevus võib tuleneda sellest, et Sigurgeirsson jt võrdlesid ekspressiooni proliferatiivse faasi ja sekretoorse faasi LH+8 päevade vahel, mistõttu võivad töös leitud erinevused peegeldada pigem muutuseid proliferatiivse ja sekretoorse tsükelifaasi vahel kui viidata retseptiivse endomeetriumi olemusele.

Käesolevas töös oli miR-21-5p ekspressioon endomeetriumi retseptiivses faasi suurenenud. miR-21 inhibeerib fosfataaside ekspressiooni, mis vähendab MAPK signaaliraja aktiivsust (Musilova ja Mraz, 2015). Endomeetriumi stroomarakkudes on näidatud, et MAPK signaalrada on oluline vaskulaarse endoteeli kasvufaktori VEGF ekspressiooni stimuleerimisel (Zhang jt., 2002), VEGF on aga osaleb angiogenees ning on oluline komponent endomeetriumi regeneratsioonil ning küpsemisel..

Sha ja kolleegid näitasid miR-21\* suurenenud ekspressiooni tervete naiste LH+7 endomeetriumis võrrelduna LH+2 endomeetriumiga (Sha jt., 2011). miR-21\* ning meie uuritud miR-21-5p pärinevad mõlemad sama prekursor-miRNA juuksenõelstruktuuri erinevatest ahelatest (-3p ja -5p) ning võivad mõlemad olla funktsionaalselt aktiivsed, kuid tärniga tähistatakse miRNA vormi, mis on üldiselt kudedes ja rakkudes madalama ekspressiooniga

(Krol jt., 2010; Winter jt., 2009). Meie ja varem avaldatud tööde tulemuste põhjal võib spekuloida, et miR-21-5p on roll endomeetriumi retseptiivsuse kujunemisel.

miR-141-3p kuulub miR-200 perekonda, mille üheks sihtmärgiks on E-kadheriini transkriptsioonilised repressorid *zinc finger E-box binding homeobox* (ZEB)-1 ja ZEB2 (Comijn jt., 2001). E-kadheriin on oluline rakuadhesioonis ja arvatavasti ka retseptiivse endomeetriumi kujunemisel ning embrüo implantatsiooni algusetappidel. Hiirtel on näidatud suurenenud E-kadheriini ekspressiooni implantatsioonieelse emaka epiteelirakkude apikaalmembraanis (Jha jt., 2006) ning samuti trofektodermi ja emakaepiteeli rakkude vahelises fokaalkontaktis. Samuti on näidatud E-kadheriini vähenenud ekspressiooni seletamatu korduva raseduse katkemisega naiste endomeetriumis tsükli LH+7 päeval (Yang jt., 2017). Käesolevas töös oli miR-141-3p ekspressioon endomeetriumi vastuvõtlikus faasis suurenenud, mis on kooskõlas miR-200 perekonna funktsiooniga – miR-141-3p ekspressiooni suurenedes on tema sihtmärgid *ZEB1* ja *ZEB2* inaktiivsed ning E-kadheriini ekspressioon suureneb. miR-200 perekonna inhibitsioonil E-kadheriini ekspressioon väheneb (Park jt., 2008).

Antud uuringus kasutati miRNAde profiili määramiseks endomeetriumi kudet, mis ei võimalda hinnata rakupopulatsiooni-spetsiifilist ekspressiooni. Endomeetriumi vastuvõtlikkuse korral aga toimuvad koos morfoloogilised muutused, mis võivad mõjutada rakkude arvukust, mistõttu on erinevates menstruaaltsükli faasides võetud endomeetriumi biopsiates varieeruv epiteelialsete ja stroomarakkude osakaal (Johannisson jt., 1982). Kuna miR-200 perekonna miRNAde ekspressioon endomeetriumis on epiteeli rakkude spetsiifiline (Saare jt., 2014) siis ei saa välistada, et uuringu raames leitud muutused miR-141 tasemetes LH+2 ja LH+8 biopsiate vahel peegeldavad eelkõige koos toimunud rakupopulatsioonide arvukuse muutuseid, mis on omakorda vajalikud endomeetriumi vastuvõtlikkuse kujunemiseks.

Endomeetriumi markerite määramist võib mõjutada ka biopsiate kogumise strateegia. Käesolevas töös koguti eelretseptiivse ning retseptiivse faasi proovid samadelt naistelt ning ühes menstruaaltsükli. Proovide paarisanalüüs vähendab patsientide vahelise varieeruvuse mõju analüüsile, samas endomeetriumi biopsia võtmise tulemusel võivad avalduda mitmesugused koekahjustusest põhjustatud reaktsioonid, mis mõjutavad järgnevas biopsias uuritavate miRNAde ekspressiooni.

Endomeetriumi koe põhistel retseptiivsuse määramise testidel on oma piirangud, kuna biopsia võtmine on ebamugav patsiendile ning osadel juhtudel ei pruugi see õnnestuda (Edgell jt., 2013; Ponnampalam jt., 2004). Vereproovist detekteeritavad rakuvabad miRNAd on väga stabiilsed

ning vastupidavad erinevatele mõjutustele (Chen jt., 2008). Vereproovi võtmise minimaalne invasiivsus ning tsirkuleerivate miRNAde stabiilsus muudab vereplasma miRNA-d atraktiivseteks kandidaat-biomarkeriteks täpse implantatsiooniakna leidmiseks (Paranjape jt., 2009). Antud töös määrasime lisaks endomeetriumi miRNAdele ekspressioonierinevusi ka tervete naiste preretseptiivse ning retseptiivse menstruaaltsükli faasi ajal kogutud vereplasma proovidest. Ühegi sekveneerimisel tuvastatud vereplasma miRNA ekspressioonierinevus tsükli faaside vahel PCR meetodil ei kinnitunud. Samas on saadud tulemused kooskõlas eelnevalt läbiviidud uurimusega, kus määrati tervete naiste vereplasma miRNA profiil menstruaaltsükli neljas erinevas ajapunktis, kuid miRNA erinevusi valitud tsükli ajapunktide vahel ei leitud (Rekker jt., 2013). Lisaks võrdlesime käesolevas töös miR-5684 ekspressiooni viljatute naiste ning tervete naiste menstruaaltsükli LH+8 päeval kogutud vereplasma proovidest, kuid ekspressioonitasemes olulist erinevust ei leidnud.

Põhjuseid, miks vereplasma miRNAde valideerimisel ekspressioonitasemete erinevused ei kinnitunud, võib olla mitmeid. Esiteks võivad uuritud miRNA-d olla sekveneerimisandmete analüüsi valepositiivsed tulemused, kuna proovide arv oli antud uuringus suhteliselt väike. Lisaks on ekspressioonitöodes väga oluline referentsgeenide valik. Universaalset miRNA-d, mille tase ei sõltu välistest teguritest ning mida saaks kasutada referentsina tsirkuleerivate miRNAde uuringutes, seni leitud pole. Meie kasutasime sekveneerimisandmete põhjal välja valitud referents-miRNA-sid, mille tase vereplasma proovides oli võimalikult vähese varieeruvusega. Antud uuringu andmete põhjal ei saa aga välistada, et kasutatud referentside tase ei sõltu mõnest muust faktorist, kuna on näidatud, et tsirkuleerivate miRNAde tase võib mõjutatud olla vererakkude arvukuse muutustest hemolüüsist (Pritchard jt., 2012b) ja verevõtu ajast (Rekker jt., 2015). 2011. aastal avaldatud töös uuriti miRNAde ekspressioonierinevusi reproduktiivses eas naiste perifeerses veres ning leiti, et vanus mõjutab miRNAde ekspressioonitaset (Sredni jt., 2011). Meie uurimuses oli tervete naiste ning viljatute naiste keskmise vanuse vahe seitse aastat. Korrelatsioonanalüüsil ei leidnud me seost vanuse ja uuritud miRNA taseme vahel, mistõttu on vähe tõenäoline, et uuritavate naiste vanus oleks analüüsil miR-5684 taseme tulemusi mõjutanud.

Lisaks annoteeritud miRNAdele analüüsisime varem kirjeldamata miRNA järjestusi. Endomeetriumi proovidest leidsime 41 ja plasmaproovidest 38 seni annoteerimata miRNA-d. Huvitava leiuna võib välja tuua endomeetriumi proovidest leitud neli kandidaat-miRNA-d, mida detekteerisime vaid LH+8 ajapunkti proovidest. Nendest ühe miRNA prekursorjärjestus paiknes intergeenses piirkonnas, ülejäänud *OPRD1*, *RHOQ* ja *TADA2A* geenide intronites. Nimetatud geenide osalust endomeetriumi retseptiivsuse kujunemises uuritud pole. Ei saa

väljastada, et leitud annoteerimata miRNAd osalevad retseptiivsuse kujunemisel ning võivad seetõttu osutada kandidaat-markeriteks endomeetriumi vastuvõtlikkuse määramisel. Antud miRNAd rolli mõistmiseks on vajalikud edasised bioinformaatilised ja funktsionaalsed uuringud.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti tervete ja viljatute naiste endomeetriumi koest ning vereplasmast detekteeritud miRNAde ekspressioonierinevusi eelretseptiivses ning retseptiivses menstruaaltsükli faasis kasutades qRT-PCR meetodit. Töö peamiseks eesmärgiks oli kinnitada NOTED projekti raames leitud miRNAde ekspressioonierinevused, kuna leitud miRNAd võivad mängida rolli vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel ja neid saaks kasutada biomarkerina vastuvõtliku endomeetriumi määramiseks.

Katsete tulemusena selgus, et endomeetriumi koes oli miR-21-5p ja miR-141-3p tase menstruaaltsükli LH+8 päeval oluliselt kõrgem ning miR-449a tase oluliselt madalam võrreldes LH+2 päevaga. Uuritavad miRNAd on seotud endomeetriumi vastuvõtlikkuse kujunemisel ning embrüo implantatsioonil oluliste protsesside – angiogeneesi, apoptoosi ja raku adhesiooni reguleerimisega.

Vereplasmas ühegi uuritava miRNA ekspressioonitaseme muutused kinnitust ei leidnud, mis võib olla tingitud erinevatest põhjustest. On võimalik, et uuringus kasutatud referents-miRNAde tase on mõjutatud välistest teguritest nagu verevõtu aeg ja hemolüüs. Samuti võivad uuritud miRNAd olla sekveneerimisandmete analüüsi valepositiivsed tulemused. Samas on uuringu tulemused kooskõlas eelnevate avaldatud töödega mis viitab sellele, et vereplasmast ei ole võimalik retseptiivse endomeetriumi määramiseks annoteeritud miRNAsid kasutada.

Teiseks eesmärgiks oli leida sekveneerimisandmete põhjal endomeetriumi koest ning vereplasmast seni annoteerimata miRNAsid, mis võiks peegeldada muutusi organismis endomeetriumi vastuvõtlikkuse ajal ning lisada uusi retseptiivse endomeetriumi kandidaatmarkereid. Endomeetriumi proovidest leidsime 41 ja plasmaproovidest 38 seni annoteerimata miRNAd. Leitud miRNAdest neli järjestust detekteerisime vaid retseptiivse ajapunkti proovidest. Antud leiu põhjal võib arvata, et need miRNAd osalevad retseptiivsuse kujunemisel ning sobida kandidaat-markeriteks endomeetriumi vastuvõtlikkuse määramisel.

Käesoleva töö põhjal pakume vastuvõtliku endomeetriumi biomarkerina välja miR-21-5p, miR-141-3p ja miR-449a. Selleks, et leida vereplasmast detekteeritavaid markereid on vajalikud edasised uuringid.

# **MicroRNAs as potential biomarkers for assessing endometrial receptivity**

Liis Mägi

## **Summary**

Endometrium is hormone-dependent inner lining of the uterus which undergoes cyclic changes in order to become receptive to embryo implantation. Successful implantation requires receptive endometrium, healthy embryo and synchronized dialogue between them. Impaired endometrial receptivity resulting in embryo implantation failure remains one of the rate-limiting steps in assisted reproductive techniques (ART), as only 30% of the transferred embryos will successfully implant into the uterus. Thus, in order to improve the outcome of ART it is of importance to determine endometrial receptivity through minimally invasive measures. MicroRNAs are important posttranscriptional gene expression regulators that are shown to affect cyclic changes in the female reproductive tract and several microRNAs have been linked to endometrial receptivity and implantation.

The aim of this thesis was to find potential biomarkers for receptive endometrium by assessing miRNA expression profiles in receptive versus prereceptive human endometrium and blood plasma collected from healthy and infertile women. Endometrial biopsies and blood samples were obtained in the same patient two and eight days after the luteinizing hormone (LH) surge (LH+2 and LH+8, respectively) and miRNA-specific qRT-PCR was performed to find differentially expressed miRNAs between sample groups.

In healthy endometrium, the expression levels of hsa-miR-449a, hsa-miR-21-5p and hsa-miR-141-3p showed statistically significant differences between receptive (LH+8) and prereceptive (LH+2) endometrium. Thus, mentioned miRNAs potentially regulate genes involved in endometrial receptivity and we propose them as biomarkers for assessing endometrial receptivity.

Blood plasma analysis showed that the expression of selected miRNAs was homogeneous between sample groups. No statistically significant expression changes were identified in the miRNA levels between healthy and infertile women and between samples collected from healthy women in LH+2 and LH+8 days of their menstrual cycle.

Furthermore, we identified 41 novel candidate miRNAs in endometrium and 38 in blood plasma. However their role in endometrial receptivity remains to be elucidated.

## **TÄNUAVALDUSED**

Tahan tänada oma juhendajaid Kadri Rekkerit, Martin Pooki ja Alar Aintsi igakülgse abi, toetuse ja nõuannete eest.

Avaldan tänu ka Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuse kollektiivile.

Tänan oma perekonda ja lähedasi mõistva suhtumise ja innustuse eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Achache, H., and Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum. Reprod. Update* 12, 731–746.

Altmäe, S., Martinez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Ruiz-Alonso, M., Stavreus-Evers, A., Horcajadas, J.A., and Salumets, A. (2013). MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 Regulate Human Endometrial Receptivity. *Reprod. Sci.* 20, 308–317.

Altmäe, S., Esteban, F.J., Stavreus-Evers, A., Simón, C., Giudice, L., Lessey, B.A., Horcajadas, J.A., Macklon, N.S., D’Hooghe, T., Campoy, C., et al. (2014). Guidelines for the design, analysis and interpretation of “omics” data: focus on human endometrium. *Hum. Reprod. Update* 20, 12–28.

Andreasen, D., Fog, J.U., Biggs, W., Salomon, J., Dahlsveen, I.K., Baker, A., and Mouritzen, P. (2010). Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. *Methods* 50, S6–S9.

Aplin, J.D. (2000). The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 14, 757–764.

Aplin, J.D., Fazleabas, A.T., Glasser, S.R., Giudice, L.C. (2008). Section IV Establishment of Pregnancy. *In The endometrium: molecular, cellular and clinical perspectives*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Informa Healthcare.

Apparao, K.B., Murray, M.J., Fritz, M.A., Meyer, W.R., Chambers, A.F., Truong, P.R., and Lessey, B.A. (2001). Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4991–5000.

Baazeem, A., Belzile, E., Ciampi, A., Dohle, G., Jarvi, K., Salonia, A., Weidner, W., and Zini, A. (2011). Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur. Urol.* 60, 796–808.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs. *Cell* 116, 281–297.

Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonné, R., and Bertrand, E. (2003). Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res.* 31, 6593–6597.

Bentin-Ley, U., Lindhard, A., Ravn, V., Islin, H., and Sørensen, S. (2011). Glycodelin in endometrial flushing fluid and endometrial biopsies from infertile and fertile women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 156, 60–66.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.

Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 36, D149–D153.

Bhusane, K., Bhutada, S., Chaudhari, U., Savardekar, L., Katkam, R., and Sachdeva, G. (2016). Secrets of Endometrial Receptivity: Some Are Hidden in Uterine Secretome. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 75, 226–236.



- Biomarkers Definitions Working Group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89–95.
- Boeddeker, S.J., and Hess, A.P. (2015). The role of apoptosis in human embryo implantation. *J. Reprod. Immunol.* 108, 114–122.
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A., and Nygren, K.G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 1506–1512.
- Boomsma, C.M., Kavelaars, A., Eijkemans, M.J.C., Amarouchi, K., Teklenburg, G., Gutknecht, D., Fauser, B.J.C.M., Heijnen, C.J., and Macklon, N.S. (2009). Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reprod. Biomed. Online* 18, 85–94.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101.
- Bourdiec, A., Calvo, E., Rao, C.V., and Akoum, A. (2013). Transcriptome Analysis Reveals New Insights into the Modulation of Endometrial Stromal Cell Receptive Phenotype by Embryo-Derived Signals Interleukin-1 and Human Chorionic Gonadotropin: Possible Involvement in Early Embryo Implantation. *PLoS ONE* 8.
- Brayman, M.J., Dharmaraj, N., Lagow, E., and Carson, D.D. (2007). MUC1 expression is repressed by protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription- $\gamma$ . *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 2725–2737.
- Broekmans, F.J., Knauff, E.A.H., te Velde, E.R., Macklon, N.S., and Fauser, B.C. (2007). Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 18, 58–65.
- Buckley, P.G., Alcock, L., Bryan, K., Bray, I., Schulte, J.H., Schramm, A., Eggert, A., Mestdagh, P., Preter, K.D., Vandesompele, J., et al. (2010). Chromosomal and MicroRNA Expression Patterns Reveal Biologically Distinct Subgroups of 11q- Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 16, 2971–2978.
- Bulun, S.E. (2009). Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 360, 268–279.
- Burney, R.O., Talbi, S., Hamilton, A.E., Vo, K.C., Nyegaard, M., Nezhat, C.R., Lessey, B.A., and Giudice, L.C. (2007). Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 148, 3814–3826.
- Casals, G., Ordi, J., Creus, M., Fábregues, F., Carmona, F., Casamitjana, R., and Balasch, J. (2012). Expression pattern of osteopontin and  $\alpha\beta 3$  integrin during the implantation window in infertile patients with early stages of endometriosis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27, 805–813.
- Chan, R.W.S., Schwab, K.E., and Gargett, C.E. (2004). Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.* 70, 1738–1750.
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179.

- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–744.
- Cogswell, J.P., Ward, J., Taylor, I.A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kemppainen, J., Brown, D., Chen, C., et al. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alzheimers Dis. JAD* 14, 27–41.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 7, 1267–1278.
- Coutifaris, C., Myers, E.R., Guzick, D.S., Diamond, M.P., Carson, S.A., Legro, R.S., McGovern, P.G., Schlaff, W.D., Carr, B.R., Steinkampf, M.P., et al. (2004). Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil. Steril.* 82, 1264–1272.
- Davidson, L.M., and Coward, K. (2016). Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 108, 19–32.
- Denker, H.W. (1993). Implantation: a cell biological paradox. *J. Exp. Zool.* 266, 541–558.
- Díaz-Gimeno, P., Horcajadas, J.A., Martínez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Alamá, P., Pellicer, A., and Simón, C. (2011). A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil. Steril.* 95, 50–60, 60.e1-15.
- Diedrich, K., Fauser, B.C.J.M., Devroey, P., and Griesinger, G. (2007). The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum. Reprod. Update* 13, 365–377.
- Dimitriadis, E., Nie, G., Hannan, N.J., Paiva, P., and Salamonsen, L.A. (2010). Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 313–322.
- Domínguez, F., Remohí, J., Pellicer, A., and Simón, C. (2003). Human endometrial receptivity: a genomic approach. *Reprod. Biomed. Online* 6, 332–338.
- Edgell, T.A., Rombauts, L.J.F., and Salamonsen, L.A. (2013). Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reprod. Biomed. Online* 27, 486–496.
- Edmonds, D.K. (2012). Infertility, p. 567-579. *In Dewhurst's Textbook of Obstetrics and Gynaecology*, 8nd ed. Wiley-Blackwell, Inglistmaa.
- Eiring, A.M., Harb, J.G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J.J., Spizzo, R., Liu, S., Schwind, S., Santhanam, R., Hickey, C.J., et al. (2010). miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts. *Cell* 140, 652–665.
- Enders, A.C., and Schlafke, S. (1969). Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am. J. Anat.* 125, 1–29.

- Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., and Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat. Res.* 717, 85–90.
- European IVF-Monitoring Consortium (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Kupka, M.S., D’Hooghe, T., Ferraretti, A.P., de Mouzon, J., Erb, K., Castilla, J.A., Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., et al. (2016). Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 31, 233–248.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4–NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1211–1217.
- Fadhlaoui, A., Bouquet de la Jolinière, J., and Feki, A. (2014). Endometriosis and Infertility: How and When to Treat? *Front. Surg.* 1.
- Fernández-Hernando, C., Ramírez, C.M., Goedeke, L., and Suárez, Y. (2013). MicroRNAs in Metabolic Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 178–185.
- Fogli, S., Polini, B., Carpi, S., Pardini, B., Naccarati, A., Dubbini, N., Lanza, M., Breschi, M.C., Romanini, A., and Nieri, P. (2017). Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 39, 1010428317701646.
- Friedländer, M.R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., Knespel, S., and Rajewsky, N. (2008). Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat. Biotechnol.* 26, 407–415.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
- Fritz, M.A., Speroff, L. (2011). Reproductive physiology p. 1-329; Infertility, p.1135 - 1849. *In Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, 8<sup>nd</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G.G. (2012). The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *PLoS ONE* 7.
- Garcia-Velasco, J.A., Fassbender, A., Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., D’Hooghe, T., and Simon, C. (2015). Is endometrial receptivity transcriptomics affected in women with endometriosis? A pilot study. *Reprod. Biomed. Online* 31, 647–654.
- Garrido-Gómez, T., Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Diaz-Gimeno, P., Vilella, F., and Simón, C. (2013). Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil. Steril.* 99, 1078–1085.
- Gelbaya, T.A., Potdar, N., Jevé, Y.B., and Nardo, L.G. (2014). Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstet. Gynecol. Surv.* 69, 109–115.
- Gipson, I.K., Blalock, T., Tisdale, A., Spurr-Michaud, S., Allcorn, S., Stavreus-Evers, A., and Gemzell, K. (2008). MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive

human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol. Reprod.* 78, 134–142.

Gonzalez, S., Pisano, D.G., and Serrano, M. (2008). Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 2601–2608.

von Grothusen, C., Lalitkumar, S., Rao Boggavarapu, N., Gemzell-Danielsson, K., and Lalitkumar, P.G. (2014). Recent Advances in Understanding Endometrial Receptivity: Molecular Basis and Clinical Applications. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 148–157.

Guerau-de-Arellano, M., Alder, H., Ozer, H.G., Lovett-Racke, A., and Racke, M.K. (2012). miRNA profiling for biomarker discovery in multiple sclerosis: From microarray to deep sequencing. *J. Neuroimmunol.* 248, 32–39.

Haller-Kikkatalo, K., Sarapik, A., Salumets, A., Uibo, R. (2009). Autoimmuunsus ja naise viljatus I. Soodumus autoimmuunsete reaktsioonide tekkeks. *Eesti Arst*; 88:14–9.

Hamatani, T., Daikoku, T., Wang, H., Matsumoto, H., Carter, M.G., Ko, M.S.H., and Dey, S.K. (2004). Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10326–10331.

Hammond, S.M. (2015). An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 3–14.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016–3027.

Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M., and Sczakiel, G. (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.* 28, 655–661.

Harper, M.J. (1992). The implantation window. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 6, 351–371.

Hawkins, S.M., and Matzuk, M.M. (2008). Menstrual Cycle: Basic Biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1135, 10–18.

He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522–531.

Heneghan, H.M., Miller, N., McAnena, O.J., O'Brien, T., and Kerin, M.J. (2011). Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E846-850.

Hey, N.A., Graham, R.A., Seif, M.W., and Aplin, J.D. (1994). The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 337–342.

Horne, A.W., Lalani, E.-N., Margara, R.A., Ryder, T.A., Mobberley, M.A., and White, J.O. (2005). The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 216–229.

Huang, J.Y.J., and Rosenwaks, Z. (2012). In vitro fertilisation treatment and factors affecting success. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 26, 777–788.

- Jabbour, H.N., Kelly, R.W., Fraser, H.M., and Critchley, H.O.D. (2006). Endocrine Regulation of Menstruation. *Endocr. Rev.* 27, 17–46.
- Jensen, S.G., Lamy, P., Rasmussen, M.H., Ostensfeld, M.S., Dyrskjöt, L., Ørntoft, T.F., and Andersen, C.L. (2011). Evaluation of two commercial global miRNA expression profiling platforms for detection of less abundant miRNAs. *BMC Genomics* 12, 435.
- Jha, R.K., Titus, S., Saxena, D., Kumar, P.G., and Laloraya, M. (2006). Profiling of E-cadherin, beta-catenin and Ca(2+) in embryo-uterine interactions at implantation. *FEBS Lett.* 580, 5653–5660.
- Johannisson, E., Parker, R.A., Landgren, B.M., and Diczfalusy, E. (1982). Morphometric analysis of the human endometrium in relation to peripheral hormone levels. *Fertil. Steril.* 38, 564–571.
- Jose-Miller, A.B., Boyden, J.W., and Frey, K.A. (2007). Infertility. *Am. Fam. Physician* 75, 849–856.
- Kalinina, A., and Matt, K. (2003). Autoantikehade osa naiseviljatuse tekkes (OÜ Celsius Healthcare).
- Kao, H.-W., Pan, C.-Y., Lai, C.-H., Wu, C.-W., Fang, W.-L., Huang, K.-H., and Lin, W.-C. (2017). Urine miR-21-5p as a potential non-invasive biomarker for gastric cancer. *Oncotarget*.
- Kasinski, A.L., Kelnar, K., Stahlhut, C., Orellana, E., Zhao, J., Shimer, E., Dysart, S., Chen, X., Bader, A.G., and Slack, F.J. (2015). A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer. *Oncogene* 34, 3547–3555.
- Kathrins, M., and Niederberger, C. (2016). Diagnosis and treatment of infertility-related male hormonal dysfunction. *Nat. Rev. Urol.* 13, 309–323.
- Kelkar, R.L., Meherji, P.K., Kadam, S.S., Gupta, S.K., and Nandedkar, T.D. (2005). Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure. *J. Reprod. Immunol.* 66, 53–67.
- Kenny, L.C., Lavender, T., McNamee, R., O'Neill, S.M., Mills, T., and Khashan, A.S. (2013). Advanced Maternal Age and Adverse Pregnancy Outcome: Evidence from a Large Contemporary Cohort. *PLoS ONE* 8.
- Khraiwesh, B., Arif, M.A., Seumel, G.I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., and Frank, W. (2010). Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 140, 111–122.
- Kichukova, T.M., Popov, N.T., Ivanov, I.S., and Vachev, T.I. (2017). Profiling of Circulating Serum MicroRNAs in Children with Autism Spectrum Disorder using Stem-loop qRT-PCR Assay. *Folia Med. (Plovdiv)* 59, 43–52.
- Kim, D.H., Sætrom, P., Snøve, O., and Rossi, J.J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16230–16235.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., and Ochiya, T. (2010). microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 1, 7.

- Kresowik, J.D.K., Devor, E.J., Van Voorhis, B.J., and Leslie, K.K. (2014). MicroRNA-31 is significantly elevated in both human endometrium and serum during the window of implantation: a potential biomarker for optimum receptivity. *Biol. Reprod.* *91*, 17.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 597–610.
- Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* *30*, 363–364.
- Lai, C.-Y., Yu, S.-L., Hsieh, M.H., Chen, C.-H., Chen, H.-Y., Wen, C.-C., Huang, Y.-H., Hsiao, P.-C., Hsiao, C.K., Liu, C.-M., et al. (2011). MicroRNA Expression Aberration as Potential Peripheral Blood Biomarkers for Schizophrenia. *PLOS ONE* *6*, e21635.
- Lalitkumar, S., Boggavarapu, N.R., Menezes, J., Dimitriadis, E., Zhang, J.-G., Nicola, N.A., Gemzell-Danielsson, K., and Lalitkumar, L.P.G. (2013). Polyethylene glycated leukemia inhibitory factor antagonist inhibits human blastocyst implantation and triggers apoptosis by down-regulating embryonic AKT. *Fertil. Steril.* *100*, 1160–1169.e2.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., et al. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *141*, 672–675.
- Lédée-Bataille, N., Laprée-Delage, G., Taupin, J.-L., Dubanchet, S., Frydman, R., and Chaouat, G. (2002). Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 213–218.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4051–4060.
- Legro, R.S., Arslanian, S.A., Ehrmann, D.A., Hoeger, K.M., Murad, M.H., Pasquali, R., Welt, C.K., and Endocrine Society (2013). Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 4565–4592.
- Leshkowitz, D., Horn-Saban, S., Parmet, Y., and Feldmesser, E. (2013). Differences in microRNA detection levels are technology and sequence dependent. *RNA* *19*, 527–538.
- Lessey, B.A. (2010). Fine Tuning of Endometrial Function by Estrogen and Progesterone Through microRNAs. *Biol. Reprod.* *82*, 653–655.
- Lessey, B.A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S.M., and Buck, C.A. (1992). Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J. Clin. Invest.* *90*, 188–195.
- Lessey, B.A., Castelbaum, A.J., Sawin, S.W., and Sun, J. (1995). Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil. Steril.* *63*, 535–542.

- Lewis, B.P., Shih, I. -hun., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115, 787–798.
- Li, C., Yin, Y., Liu, X., Xi, X., Xue, W., and Qu, Y. (2017). Non-small cell lung cancer associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, validation and clinical significance. *Oncotarget* 8, 24564–24578.
- Lim, H.J., and Wang, H. (2010). Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J. Clin. Invest.* 120, 1004–1015.
- Liu, W., Niu, Z., Li, Q., Pang, R.T.K., Chiu, P.C.N., and Yeung, W.S.-B. (2016). MicroRNA and Embryo Implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 75, 263–271.
- Liu, Y., Lee, K.-F., Ng, E.H.Y., Yeung, W.S.B., and Ho, P.-C. (2008). Gene expression profiling of human peri-implantation endometria between natural and stimulated cycles. *Fertil. Steril.* 90, 2152–2164.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Lizé, M., Klimke, A., and Dobbelstein, M. (2011). MicroRNA-449 in cell fate determination. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 2874–2882.
- Lu, Y., Gao, H., Li, B., Zheng, Y., Ye, Y., Qian, Y., Xu, C., Huang, H., and Jin, F. (2012). Different sperm sources and parameters can influence intracytoplasmic sperm injection outcomes before embryo implantation. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 13, 1–10.
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 512–517.
- Mahajan, N. (2015). Endometrial receptivity array: Clinical application. *J. Hum. Reprod. Sci.* 8, 121–129.
- Margalioth, E.J., Ben-Chetrit, A., Gal, M., and Eldar-Geva, T. (2006). Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum. Reprod.* 21, 3036–3043.
- Marieb, E., Hoehn, K. (2010). The Reproductive System, p.1045. *In Human anatomy & physiology*, , 8<sup>nd</sup> ed. Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- Martini, F.H., Bartholomew, E.F., Ober, W.C. (2013). The reproductive system, chapter 19. *In Essentials of anatomy & physiology*, 6<sup>th</sup> ed. Pearson, Boston.
- Mascarenhas, M.N., Flaxman, S.R., Boerma, T., Vanderpoel, S., and Stevens, G.A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 9.
- Meseguer, M., Aplin, J.D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J.E., Martín, J.C., Remohí, J., Pellicer, A., and Simón, C. (2001). Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol. Reprod.* 64, 590–601.

- Milger, K., Götschke, J., Krause, L., Nathan, P., Alessandrini, F., Tufman, A., Fischer, R., Bartel, S., Theis, F.J., Behr, J., et al. (2017). Identification of a plasma miRNA biomarker-signature for allergic asthma: a translational approach. *Allergy*.
- Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J.I., Williams, S., Bocca, S., and Oehninger, S. (2005). In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20, 2104–2117.
- Moreno-Moya, J.M., Vilella, F., and Simón, C. (2014). MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertil. Steril.* 101, 1516–1523.
- Musilova, K., and Mraz, M. (2015). MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia* 29, 1004–1017.
- Nikas, G. (2000). Endometrial Receptivity: Changes in Cell-Surface Morphology. *Semin. Reprod. Med.* 18, 229–236.
- Nishi, E., and Klagsbrun, M. (2004). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is a mediator of multiple physiological and pathological pathways. *Growth Factors Chur Switz.* 22, 253–260.
- Noyes, R.W., Hertig, A.W., Rock, J. (1950). Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril.* 1: 3
- Ohanian, M., Humphreys, D.T., Anderson, E., Preiss, T., and Fatkin, D. (2013). A heterozygous variant in the human cardiac miR-133 gene, MIR133A2, alters miRNA duplex processing and strand abundance. *BMC Genet.* 14, 18.
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 30, 460–471.
- Pan, X., Wang, Z.-X., and Wang, R. (2010). MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biol. Ther.* 10, 1224–1232.
- Paranjape, T., Slack, F.J., and Weidhaas, J.B. (2009). MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut* 58, 1546–1554.
- Park, S.-M., Gaur, A.B., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 22, 894–907.
- Ponnampalam, A.P., Weston, G.C., Trajstman, A.C., Susil, B., and Rogers, P.A.W. (2004). Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 879–893.
- Ponsuksili, S., Tesfaye, D., Schellander, K., Hoelker, M., Hadlich, F., Schwerin, M., and Wimmers, K. (2014). Differential Expression of miRNAs and Their Target mRNAs in Endometria Prior to Maternal Recognition of Pregnancy Associates with Endometrial Receptivity for In Vivo- and In Vitro-Produced Bovine Embryos. *Biol. Reprod.* 91.
- Pratt, A.J., and MacRae, I.J. (2009). The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *J. Biol. Chem.* 284, 17897–17901.



- Pritchard, C.C., Cheng, H.H., and Tewari, M. (2012a). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 358–369.
- Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F., and Tewari, M. (2012b). Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* *5*, 492–497.
- Qu, K., Zhang, X., Lin, T., Liu, T., Wang, Z., Liu, S., Zhou, L., Wei, J., Chang, H., Li, K., et al. (2017). Circulating miRNA-21-5p as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer: evidence from comprehensive miRNA expression profiling analysis and clinical validation. *Sci. Rep.* *7*, 1692.
- Rai, R., and Regan, L. (2006). Recurrent miscarriage. *The Lancet* *368*, 601–611.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell* *123*, 621–629.
- Reimand, K., Talja, I., Metsküla, K., Kadastik, U., Matt, K., and Uibo, R. (2001). Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. *J. Reprod. Immunol.* *51*, 167–176.
- Rekker, K., Saare, M., Roost, A.M., Salumets, A., and Peters, M. (2013). Circulating microRNA Profile throughout the Menstrual Cycle. *PLOS ONE* *8*, e81166.
- Rekker, K., Saare, M., Roost, A.M., Kaart, T., Sõritsa, D., Karro, H., Sõritsa, A., Simón, C., Salumets, A., and Peters, M. (2015). Circulating miR-200–family micro-RNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. *Fertil. Steril.* *104*, 938–946.e2.
- Robertson, S., Zhang, B., Chan, H., Sharkey, D., Barry, S., Fullston, T., and Schjenken, J. (2017). MicroRNA regulation of immune events at conception. *Mol. Reprod. Dev.* n/a-n/a.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* *26*, 139–140.
- de la Rochebrochard, E., and Thonneau, P. (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 1649–1656.
- Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., and Simón, C. (2012). The genomics of the human endometrium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1822*, 1931–1942.
- Saare, M., Rekker, K., Laisk-Podar, T., Sõritsa, D., Roost, A.M., Simm, J., Velthut-Meikas, A., Samuel, K., Metsalu, T., Karro, H., et al. (2014). High-throughput sequencing approach uncovers the miRNome of peritoneal endometriotic lesions and adjacent healthy tissues. *PloS One* *9*, e112630.
- Salamonsen, L.A., Evans, J., Nguyen, H.P.T., and Edgell, T.A. (2016). The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *75*, 218–225.

- Sarapik, A., Haller-Kikkatalo, K., Utt, M., Teesalu, K., Salumets, A., and Uiho, R. (2010). Serum anti-endometrial antibodies in infertile women - potential risk factor for implantation failure. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 63, 349–357.
- Seracchioli, R., Trevisi, M.R., Ferlini, F., Petracchi, S., Colombi, C., Borini, A., Balicchia, B., and Porcu, E. (1997). Laparoscopic surgery and assisted reproductive techniques. Combined strategies of therapy in infertile women. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 828, 316–325.
- Sha, A.-G., Liu, J.-L., Jiang, X.-M., Ren, J.-Z., Ma, C.-H., Lei, W., Su, R.-W., and Yang, Z.-M. (2011). Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertil. Steril.* 96, 150–155.e5.
- Shi, C., Han, H.J., Fan, L.J., Guan, J., Zheng, X.B., Chen, X., Liang, R., Zhang, X.W., Sun, K.K., Cui, Q.H., et al. (2017a). Diverse endometrial mRNA signatures during the window of implantation in patients with repeated implantation failure. *Hum. Fertil. Camb. Engl.* 1–12.
- Shi, C., Shen, H., Fan, L.-J., Guan, J., Zheng, X.-B., Chen, X., Liang, R., Zhang, X.-W., Cui, Q.-H., Sun, K.-K., et al. (2017b). Endometrial MicroRNA Signature during the Window of Implantation Changed in Patients with Repeated Implantation Failure. *Chin. Med. J. (Engl.)* 130, 566–573.
- Sicard, F., Gayral, M., Lulka, H., Buscail, L., and Cordelier, P. (2013). Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Mol. Ther.* 21, 986–994.
- Sigurgeirsson, B., Åmark, H., Jemt, A., Ujvari, D., Westgren, M., Lundeberg, J., and Gidlöf, S. (2017). Comprehensive RNA sequencing of healthy human endometrium at two time points of the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* 96, 24–33.
- Simón, C., Moreno, C., Remohí, J., and Pellicer, A. (1998). Cytokines and embryo implantation. *J. Reprod. Immunol.* 39, 117–131.
- Simón, C., Dominguez, F., Remohí, J., and Pellicer, A. (2001). Embryo Effects in Human Implantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 943, 1–16.
- Simon, C., Oberyé, J., Bellver, J., Vidal, C., Bosch, E., Horcajadas, J.A., Murphy, C., Adams, S., Riesewijk, A., Mannaerts, B., et al. (2005). Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles. *Hum. Reprod.* 20, 3318–3327.
- Sredni, S.T., Gadd, S., Jafari, N., and Huang, C.-C. (2011). A Parallel Study of mRNA and microRNA Profiling of Peripheral Blood in Young Adult Women. *Front. Genet.* 2, 49.
- Stephoe, P.C., and Edwards, R.G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet Lond. Engl.* 2, 366.
- Sõritsa, A., Levkov, L., Ott, P. (1997). Esimene sünnitus Eestis munarakudoonorluse tulemusena. *Eesti Arst.* 1:22–5
- Talbi, S., Hamilton, A.E., Vo, K.C., Tulac, S., Overgaard, M.T., Dosiou, C., Le Shay, N., Nezhat, C.N., Kempson, R., Lessey, B.A., et al. (2006). Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 147, 1097–1121.

- Tapia, A., Salamonsen, L.A., Manuelpillai, U., and Dimitriadis, E. (2008). Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 23, 1724–1732.
- Taylor, H.S., Arici, A., Olive, D., and Igarashi, P. (1998). HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J. Clin. Invest.* 101, 1379–1384.
- Taylor, H.S., Igarashi, P., Olive, D.L., and Arici, A. (1999). Sex steroids mediate HOXA11 expression in the human peri-implantation endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1129–1135.
- Teede, H., Deeks, A., and Moran, L. (2010). Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* 8, 41.
- Tonsiver, T., Ehrenberg, A., Ringmets, I., Saare, K., Lepik, K., Kiivet, R. A. (2013). Kehavälise viljastamise efektiivsus ja kulud Eestis. Tartu: Tartu Ülikooli tervishoiu instituut.
- Tournaye, H. (2012). Male factor infertility and ART. *Asian J. Androl.* 14, 103–108.
- Ullah, K., Rahman, T.U., Pan, H.-T., Guo, M.-X., Dong, X.-Y., Liu, J., Jin, L.-Y., Cheng, Y., Ke, Z.-H., Ren, J., et al. (2017). Serum estradiol levels in controlled ovarian stimulation directly affect the endometrium. *J. Mol. Endocrinol.*
- Unuane, D., Tournaye, H., Velkeniers, B., and Poppe, K. (2011). Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 861–873.
- Valadi, H. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol* 9, 654–659.
- Van Voorhis, B.J. (2007). In Vitro Fertilization. *N. Engl. J. Med.* 356, 379–386.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–433.
- Waller, R., Goodall, E.F., Milo, M., Cooper-Knock, J., Da Costa, M., Hobson, E., Kazoka, M., Wollff, H., Heath, P.R., Shaw, P.J., et al. (2017). Serum miRNAs miR-206, 143-3p and 374b-5p as potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neurobiol. Aging* 55, 123–131.
- Wang, C., Yang, C., Chen, X., Yao, B., Yang, C., Zhu, C., Li, L., Wang, J., Li, X., Shao, Y., et al. (2011). Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin. Chem.* 57, 1722–1731.
- Wang, J., Chen, J., and Sen, S. (2016). MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J. Cell. Physiol.* 231, 25–30.
- Weickmann, J.L., and Glitz, D.G. (1982). Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations. *J. Biol. Chem.* 257, 8705–8710.

- Weimar, C.H.E., Macklon, N.S., Uiterweer, P., D, E., Brosens, J.J., and Gellersen, B. (2013). The motile and invasive capacity of human endometrial stromal cells: implications for normal and impaired reproductive function. *Hum. Reprod. Update* 19, 542–557.
- Whitley, G.S.J., and Cartwright, J.E. (2010). Cellular and Molecular Regulation of Spiral Artery Remodelling: Lessons from the Cardiovascular Field. *Placenta* 31, 465–474.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11, 228–234.
- Wu, W., Lin, Z., Zhuang, Z., and Liang, X. (2009). Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer Prev.* 18, 50–55.
- Yang, J.-S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., and Lai, E.C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. *RNA* 17, 312–326.
- Yang, Y., Chen, X., Saravelos, S.H., Liu, Y., Huang, J., Zhang, J., and Li, T.C. (2017). HOXA-10 and E-cadherin expression in the endometrium of women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.* 107, 136–143.e2.
- Ye, X., Huang, N., Liu, Y., Paroo, Z., Huerta, C., Li, P., Chen, S., Liu, Q., and Zhang, H. (2011). Structure of C3PO and Mechanism of Human RISC Activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 650–657.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, and World Health Organization (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil. Steril.* 92, 1520–1524.
- Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Köppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., et al. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* 2, ra81.
- Zhang, Q., Liu, S.-H., Erikson, M., Lewis, M., and Unemori, E. (2002). Relaxin activates the MAP kinase pathway in human endometrial stromal cells. *J. Cell. Biochem.* 85, 536–544.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* 7, 203–214.
- (2008). *The endometrium: molecular, cellular and clinical perspectives* (London: Informa Healthcare).
- (2014). Female age-related fertility decline. *Fertil. Steril.* 101, 633–634.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID JA PROGRAMMID

1. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) (5.05.2017)
2. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) 2016 fact sheet  
[www.eshre.eu/~media/sitecore-files/Guidelines/ART-fact-sheet-2016.pdf?la=en](http://www.eshre.eu/~media/sitecore-files/Guidelines/ART-fact-sheet-2016.pdf?la=en)
3. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
4. <https://www.riigiteataja.ee/akt/126022015004> (16.05.2015) - Kunstliku viljastamise ja embrüokaitse seadus, RT I 1997, 51, 824 ... RT I, 26.02.2015, 4

## **LIHTLITSENTS**

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Liis Mägi (sünnikuupäev: 05.09.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „MikroRNA-d kui potentsiaalsed biomarkerid vastuvõtliku endomeetriumi määramiseks,“ mille juhendajad on Kadri Rekker, Martin Pook ning Alar Aints,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017